

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHOJI, Takashi  
SN Iwamoto Building  
6th Floor  
2-10, Iwamotocho 3-chome  
Chiyoda-ku  
Tokyo 101-0032  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 26 March 2001 (26.03.01)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference FP99-1004	
International application No. PCT/JP99/04088	International filing date (day/month/year) 29 July 1999 (29.07.99)

1. The following indications appeared on record concerning:		
<input type="checkbox"/> the applicant	<input type="checkbox"/> the inventor	<input checked="" type="checkbox"/> the agent
<input type="checkbox"/> the common representative		
Name and Address SHOJI, Takashi 1F, Dai-ichi Seno Building 9-9, Iwamotocho 3-chome Chiyoda-ku Tokyo 101-0032 Japan	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
<input type="checkbox"/> the person	<input type="checkbox"/> the name	<input checked="" type="checkbox"/> the address
<input type="checkbox"/> the nationality		
<input type="checkbox"/> the residence		
Name and Address SHOJI, Takashi SN Iwamoto Building 6th Floor 2-10, Iwamotocho 3-chome Chiyoda-ku Tokyo 101-0032 Japan	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:	

<b>The International Bureau of WIPO</b> <b>34, chemin des Colombettes</b> <b>1211 Geneva 20, Switzerland</b>  Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer  Susumu Kubo  Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	---

## PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
US Department of Commerce  
United States Patent and Trademark  
Office, PCT  
2011 South Clark Place Room  
CP2/5C24  
Arlington, VA 22202  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 16 November 2000 (16.11.00)	
International application No.: PCT/JP99/04088	Applicant's or agent's file reference: -FP99-1004
International filing date: 29 July 1999 (29.07.99)	Priority date: 11 May 1999 (11.05.99)
Applicant: ENDO, Yaeta et al	

## 1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

02 December 1999 (02.12.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer:  J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF  
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHOJI, Tskashi  
1F, Dai-ichi Seno Building  
9-9, Iwamotocho 3-chome  
Chiyoda-ku  
Tokyo 101-0032  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 19 August 1999 (19.08.99)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference FP99-1004	International application No. PCT/JP99/04088

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

WAKENYAKU CO., LTD. (for all designated States except US)

ENDO, Yaeta (all designated States)

NISHIKAWA, Shigemichi (for US)

International filing date : 29 July 1999 (29.07.99)

Priority date(s) claimed : 11 May 1999 (11.05.99)

11 May 1999 (11.05.99)

31 May 1999 (31.05.99)

Date of receipt of the record copy  
by the International Bureau : 13 August 1999 (13.08.99)

List of designated Offices :

EA : AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM

EP : AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE

National : AU,CA,CN,IL,KR,US

## ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.


In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

☒ time limits for entry into the national phase

☒ confirmation of precautionary designations

☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer:  Y. KUWAHARA 
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

67  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference FP99-1004	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/04088	International filing date (day/month/year) 29 July 1999 (29.07.99)	Priority date (day/month/year) 11 May 1999 (11.05.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12P 21/00, C12N 15/10, C12M 1/00		
Applicant WAKENYAKU CO., LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 3 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 02 December 1999 (02.12.99)	Date of completion of this report 21 March 2000 (21.03.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

In \_\_\_\_\_ onal application No.  
PCT/JP99/04088

## I. Basis of the report

## 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
pages \_\_\_\_\_ 1-28 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_ 1-14 \_\_\_\_\_, filed with the letter of 29 February 2000 (29.02.2000)
- ☒ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_ 1-9 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

## 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

## 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☒ the claims, Nos. \_\_\_\_\_ 15-22 \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04088

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability:  
citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

None of the documents cited in the international search report describe an embryo-extract cell-free protein synthesis system from which albumen has been completely removed, and this matter is not obvious to persons skilled in the art.

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED  
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHOJI, Tskashi  
1F, Dai-ichi Seno Building  
9-9, Iwamotocho 3-chome  
Chiyoda-ku  
Tokyo 101-0032  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 16 November 2000 (16.11.00)		
Applicant's or agent's file reference FP99-1004		IMPORTANT INFORMATION
International application No. PCT/JP99/04088	International filing date (day/month/year) 29 July 1999 (29.07.99)	Priority date (day/month/year) 11 May 1999 (11.05.99)
Applicant WAKENYAKU CO., LTD. et al		

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE  
National : AU, CA, CN, IL, KR, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer:  J. Zahra  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

## PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

SHOJI, Tskashi  
1F, Dai-ichi Seno Building  
9-9, Iwamotocho 3-chome  
Chiyoda-ku  
Tokyo 101-0032  
JAPON

Date of mailing (day/month/year)

16 November 2000 (16.11.00)

Applicant's or agent's file reference

FP99-1004

## IMPORTANT NOTICE

International application No.

PCT/JP99/04088

International filing date (day/month/year)

29 July 1999 (29.07.99)

Priority date (day/month/year)

11 May 1999 (11.05.99)

Applicant

WAKENYAKU CO., LTD. et al

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

AU,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

CA,CN,EA,EP,IL

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 16 November 2000 (16.11.00) under No. WO 00/68412

## REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

## REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

J. Zahra

Telephone No. (41-22) 338.83.38



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHOJI, Tskashi  
1F, Dai-ichi Seno Building  
9-9, Iwamotocho 3-chome  
Chiyoda-ku  
Tokyo 101-0032  
JAPON

Date of mailing (day/month/year)

06 September 2000 (06.09.00)

Applicant's or agent's file reference

FP99-1004

## IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/JP99/04088

International filing date (day/month/year)

29 July 1999 (29.07.99)

1. The following indications appeared on record concerning:



the applicant



the inventor



the agent



the common representative

Name and Address

WAKENYAKU CO., LTD.  
17,nishimizuhoshi-cho  
Ichijoji  
Sakyo-ku  
Kyoto-shi, Kyoto 606-8171  
Japan

State of Nationality

JP

State of Residence

JP

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:



the person



the name



the address



the nationality



the residence

Name and Address

WAKENYAKU CO., LTD.  
17,nishimizuhoshi-cho  
Ichijoji  
Sakyo-ku  
Kyoto-shi  
Kyoto 606-8171  
Japan

State of Nationality

JP

State of Residence

JP

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:



the receiving Office



the International Searching Authority



the International Preliminary Examining Authority



the designated Offices concerned



the elected Offices concerned



other:

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Susumu Kuba

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

# PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

### NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF COPIES OF TRANSLATION OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHOJI, Tskashi  
1F, Dai-ichi Seno Building  
9-9, Iwamotocho 3-chome  
Chiyoda-ku  
Tokyo 101-0032  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 01 March 2001 (01.03.01)	
Applicant's or agent's file reference FP99-1004	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JF99/04088	International filing date (day/month/year) 29 July 1999 (29.07.99)
Applicant WAKENYAKU CO., LTD. et al	

#### 1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

#### 2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP, AU, CA, CN, US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

EA, IL, KR

#### 3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer  Eliott Peretti  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

EP



PCT

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)

[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 FP99-1004	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/04088	国際出願日 (日.月.年) 29.07.99	優先日 (日.月.年) 11.05.99
出願人(氏名又は名称) 和研薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第        図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C 1 2 P 2 1 / 0 0, C 1 2 N 1 5 / 1 0, C 1 2 M 1 / 0 0

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C 1 2 P 2 1 / 0 0, C 1 2 N 1 5 / 1 0, C 1 2 M 1 / 0 0

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y/A	JP, 7-203984, A(遠藤弥重太)8. 8月. 1995(08. 08. 95) (ファミリーなし)	1, 9, 13, 14/2 -8, 19-22/10- 12, 15-18
Y	WO, 98/02532, A1(INVITEK GmbH)22. 1月. 1998(22. 01. 98) & EP, 917568, A	2-8
Y	JP, 10-80295, A(日本製粉株式会社)31. 3月. 1998(31. 03. 98) (ファミリーなし)	19-22 =
A	JP, 6-503477, A(PROMEGA CORP.)21. 4月. 1994(21. 04. 94) & WO, 93/ 07287, A1 & AU, 9227921, A & EP, 566714, A & US, 5324637, A	1-17

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 7 . 0 9 . 9 9

国際調査報告の発送日

05.10.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA / JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

滝本 晶子



4 B

9 4 5 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 7-147992, A (株式会社神戸製鋼所) 13. 6月. 1995 (13. 06. 95) (ファミリーなし)	1-17



<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>C12P 21/00, C12N 15/10, C12M 1/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO00/68412</b>  <b>(43) 国際公開日</b> <b>2000年11月16日(16.11.00)</b>
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP99/04088  <b>(22) 国際出願日</b> 1999年7月29日(29.07.99)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平11/130393 1999年5月11日(11.05.99) JP 特願平11/130395 1999年5月11日(11.05.99) JP 特願平11/151599 1999年5月31日(31.05.99) JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 和研薬株式会社(WAKENYAKU CO., LTD.)(JP/JP) 〒606-8171 京都府京都市左京区一乗寺西水干町17番地 Kyoto, (JP) <b>(71) 出願人 ; および</b> <b>(72) 発明者</b> 遠藤弥重太(ENDO, Yaeta)(JP/JP) 〒791-8016 愛媛県松山市久万の台478-17 Ehime, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 西川茂道(NISHIKAWA, Shigemichi)(JP/JP) 〒525-0029 滋賀県草津市下笠町字辻出945番地1 和研薬株式会社 草津センター内 Shiga, (JP)		<b>(74) 代理人</b> 庄司 隆(SHOJI, Tskashi) 〒101-0032 東京都千代田区岩本町3丁目9番地9号 第一瀬野ビル1階 Tokyo, (JP)  <b>(81) 指定国</b> AU, CA, CN, IL, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)  <b>添付公開書類</b> 国際調査報告書 補正書・説明書
<b>(54) Title: PREPARATION CONTAINING CELL EXTRACT FOR SYNTHESIZING CELL-FREE PROTEIN AND MEANS FOR SYNTHESIZING CELL-FREE PROTEIN</b>  <b>(54) 発明の名称</b> 無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤、及び無細胞タンパク質合成手段  <b>(57) Abstract</b> A preparation for synthesizing a cell-free protein which contains a cell extract prepared by eliminating from an organism systems relating to the inhibition of self-protein synthesis reactions; an apparatus for synthesizing a cell-free protein provided with a reaction tank for synthesizing the cell-free protein; and a kit to be used therefor. The above preparation is obtained as a product which can be stored at room temperature while sustaining the biological functions of the cell extract. A means for continuously synthesizing a cell-free protein comprising a cell extract from which substances inhibiting self-protein synthesis reactions have been substantially eliminated, involving a procedure selected from among addition, preservation, exchange and discharge of a factor selected from among mRNA serving as a template in the synthesis reactions, an enzyme participating in the energy regeneration system, a substrate and an energy source.		

## 明 細 書

無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤、及び無細胞タンパク質合成手段

## 5 技術分野

本発明は、無細胞タンパク質合成系に使用する細胞・組織から調製した無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤、この製剤を安定化し、室温保存・室温輸送を可能とした製剤、及びこれら製剤を利用した無細胞タンパク質合成手段・装置の提供に関するものである。

10

## 背景技術

細胞内でおこなわれているタンパク質の合成反応は、まず遺伝情報をもつDNAからその情報がmRNAに転写され、そしてリボソームがそのmRNAの情報を翻訳して、タンパク質を合成するという工程で進行している。現在、この細胞内におけるタンパク質合成を試験管等の生体外で行う方法としては、例えばリボソームを生物体から抽出し、これらを用いて試験管内でタンパク質合成を行う無細胞タンパク質合成法の研究が盛んに行われている（特開平6-98790、特開平6-225783、特開平7-194、特開平9-291、特開平7-147992）。この方法には、リボソームの原料として、大腸菌、胚芽、家兔網状赤血球などが用いられてきた。

20

これら無細胞タンパク質合成系に使用する無細胞タンパク質合成用細胞抽出物や翻訳鑄型を除いた他の合成基質やエネルギー源及び、各種イオン等、翻訳反応に不可欠、あるいは同反応効率を高める化学物質を含む無細胞タンパク質合成反応液は常温では不安定であり、-80度摂氏以下の超低温でのみ安定な保存が可能であった。

25

無細胞タンパク質合成系は、ペプチド合成反応速度と翻訳反応の正確性において

生細胞に匹敵する性能を保持し、かつ目的とするタンパク質を複雑な精製工程を実施することなく得ることができる有用な方法である。そのため、該合成系をより有用に産業上に適用するため、合成効率の向上に関するいくつかの発明が開示されてきた。しかし、産業上の有用性向上のためには、合成効率のみならず、合成系に使用

5 用する各種の物質を安定に高品質を保持して供給することが必要である。

本発明の目的の一は、無細胞タンパク質合成系に必要な、無細胞タンパク質合成用細胞抽出物、翻訳鋳型を除いた他の合成基質、エネルギー源及び、各種イオン等、翻訳反応に不可欠、あるいは同反応効率を高める化学物質を含む無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤を、常温下にあっても、安定であり、該製剤の生物学的

10 機能を維持可能にする手段を提供することである。

また、本発明の目的の別の一は、無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤を含むキットを安定に保存、供給することによって、無細胞タンパク質合成の作業工程を簡便化する手段を提供することである。

本発明の別の目的は、無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤を使用した、  
15 生産性・生産量・簡便性を改善した無細胞タンパク質合成手段を提供することである。

## 発明の開示

本発明者等は、上記課題を解決すべく検討を行なった結果、その手段の一として  
20 原料である無細胞タンパク質合成用細胞の自己のタンパク質合成反応の阻害に関与する系を排除することにより、本発明を完成するに至った。また、本発明の別の手段の一は、調製した無細胞タンパク質合成用細胞抽出物、または無細胞タンパク質合成用細胞抽出物と無細胞タンパク質合成反応系に関与する物質に対して、凍結乾燥等の処理を導入し、乾燥製剤とすることにより、本発明を完成するに至った。  
25 さらに、本発明の別の手段の一は、上記手段によって獲得した無細胞タンパク質合成系を使った無細胞タンパク質合成方法として、分子篩の原理を応用した無細胞タ



ンパク質合成手段を提供することである。本発明の別の無細胞タンパク質合成手段は、透析膜を利用した連続無細胞タンパク質合成手段であって、選択された要素を追加導入することおよびそのための装置に関する。

## 5 図面の簡単な説明

第1図は、凍結乾燥したコムギ胚芽抽出物を $-80$ 度摂氏で2ヶ月間保存したものと、凍結乾燥していないコムギ胚芽抽出物を液体窒素中で2ヶ月間保存したものとの、タンパク質合成活性を比較した図である。図中、各シンボルは、液体窒素中に従来法で2ヶ月間保存した抽出物（□—□）、凍結乾燥後、同期間保存したもの（■—■）を示し、縦軸はタンパク質に取り込まれた放射活性（DPM/ $5\mu$ l当たりの反応液）を、横軸は $26$ 度摂氏における反応時間を示す。

第2図は、凍結乾燥抽出物の保存温度のタンパク質合成活性に与える影響を示した図である。図中、各シンボルは、室温1ヶ月間（□—□）、 $4$ 度摂氏で同期間（■—■）、 $-80$ 度摂氏で同期間（●—●）保存したものを示す。

第3図は、凍結乾燥したコムギ無細胞タンパク質合成溶液のバッチ反応系におけるタンパク質合成活性を示した図である。図中、各シンボルは、液体窒素中に従来法で2ヶ月間保存した抽出物（■—■）、凍結乾燥後、同期間保存したもの（□—□）を示す。

第4A図は、オープンカラムを利用した無細胞タンパク質合成の結果を示す写真である。レーン1は鑄型非存在、レーン3はカラム法で12時間合成した結果である。レーン2は、比較例として従来の透析法を用いる連続式無細胞タンパク質合成法で同時間合成した結果を示す。第4A図の最左レーンは分子量マーカーで、上から、 $94\text{ kDa}$ 、 $67\text{ kDa}$ 、 $43\text{ kDa}$ 、 $30\text{ kDa}$ 、 $20.1\text{ kDa}$ である。矢印は合成されたジヒドロ葉酸還元酵素を示す。

第4B図は、市販液体クロマト装置を利用した無細胞タンパク質合成の結果を示す写真である。レーン1は、比較例である従来の透析法を用いる連続式無細胞タン

パク質合成法で12時間合成した結果である。レーン2は液体クロマト装置を利用した無細胞タンパク質合成法で同時間合成した結果である。矢印は合成されたジヒドロ葉酸還元酵素を示す。

第5図は、カートリッジ装置の斜視図である。

5 第6図は、カートリッジ装置の中央断面図である。

第5図及び第6図の各符号の意味は以下の通りである。

- |       |                            |
|-------|----------------------------|
| 1     | 含浸槽                        |
| 2     | 蓋部                         |
| 3     | 透析外液                       |
| 10 4  | 透析外液の液面                    |
| 5     | 基質及び／又はエネルギー源等供給用の導入口      |
| 6     | 基質及び／又はエネルギー源等供給用の含浸槽内出口   |
| 7     | 流路                         |
| 8     | 透析外液排出用の含浸槽内導入口            |
| 15 9  | 透析外液排出用の外部排出口              |
| 9 a   | 透析外液排出用の外部排出口              |
| 10    | 流路                         |
| 11    | mRNA及び／又はエネルギー再生系酵素供給用の導入口 |
| 12    | 透析膜機能を有する媒体                |
| 20 13 | 導入口11の導入部                  |
| 14    | 膜留具                        |
| 15    | 膜端部                        |
| 16    | マグネティックスターラー               |
| 17    | 導入口5の導入部                   |
| 25 18 | 含浸槽内出口6の導入部                |
| 19    | 含浸槽内導入口8の導入部               |

20 外部排出口9の導入部

20a 外部排出口9aの導入

第7図は、mRNA及びクレアチンキナーゼの追加添加によるタンパク質の合成効果の維持を示した図である。図中、○-○はCAP付きのジヒドロ葉酸還元酵素をコードするmRNAとクレアチンキナーゼを追加添加、△-△はmRNAのみを追加添加、▽-▽はクレアチンキナーゼのみを追加添加、□-□は追加添加せず、矢印は追加添加時を示す。

第8図は、透析外液の交換によるタンパク質の合成効果の維持を示した図であり、○-○は透析外液の交換をしたもの、△-△は交換しなかったもの、矢印は交換時を示す。

第9図は、自動化装置によるタンパク質の合成効果の維持を示した図である。図中、○-○はCAP付きのジヒドロ葉酸還元酵素をコードするmRNAとクレアチンキナーゼを追加添加、△-△はmRNAを追加添加しなかったものを示し、白矢印は合成産物であるジヒドロ葉酸還元酵素を、また★印は追加したクレアチンキナーゼの染色バンドを示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

1) (無細胞タンパク質合成用細胞における自己のタンパク質合成反応の阻害に関与する系の排除)

20 本発明の一手段である、原料である無細胞タンパク質合成用細胞の自己のタンパク質合成反応の阻害に関与する系を排除することとは、原料細胞自身が含有する又は保持する自己タンパク質の合成を制御する手段を除くことを意味する。特に、本発明者が見出したこの関与する系を排除することとは、リボソーム、翻訳蛋白質因子、mRNA、tRNAに作用してその機能を抑制する物質の排除を意味する。

25 原料細胞自身が含有する又は保持するタンパク質合成機能を抑制する物質とは、例えば種子の胚乳に大量に局在することが知られている、リボソームの機能を抑制

するトリチン (Massiah, A. J., and Hartely, M. R. (1995) *Planta*, 197, 633-640)、チオニンとよばれるシステインを多く含むタンパク質 (Brummer, J., Thole, H. and Klopstech, K. (1994) *Eur. J. Biochem*, 219, 425-433)、リボヌクレアーゼ (Matsushita S., *Mem. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ.*, No. 19, 1~) 等である。

胚芽の単離段階で混入する、胚乳局在性の胚芽無細胞タンパク質合成抑制(阻害)タンパク質の一群、たとえば、トリチン、チオニン、リボヌクレアーゼ等を完全に  
10 胚芽試料から排除することによって、タンパク質合成の不活化反応を解除することができる。

つまり本発明の手段の一は、無細胞タンパク質合成用の細胞・組織からの抽出物調製に際し、生体組織や細胞の損傷時に発動する自己タンパク質合成反応阻害機構、すなわち、生理的に備わった対病原自己防御機構としての自己タンパク質合成反応  
15 破壊機構を除去する技術、破碎に伴って誘起されるタンパク質合成反応阻害活性を中和する又は除去する技術によって達成される。

本発明の原料細胞は、無細胞タンパク質合成系に汎用されている胚芽、大腸菌、および網状赤血球やガン細胞等のほか、他の生物由来の無細胞タンパク質合成用細胞も基本的に使用可能である。好ましい態様としては、胚芽であり、コムギ・大麦・  
20 イネ・コーン・ほうれん草・そば等由来のものが例示される。

これら原料細胞からの、本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物の調製は、既知の各種方法 (Johnston, F. B. et al. (1957) *Nature*, 179, 160-161) と組合せておこなうことができる。本発明の手段の一である、自己タンパク質の合成を制御する手段を除くための有用な手段は、  
25 界面活性剤、特に非イオン性の界面活性剤をもちいて原料細胞を処理することである。非イオン性の界面活性剤であるかぎりには広く利用ができるが、好適なものとしては、

ポリオキシエチレン誘導体である、ブリッジ (B r i j)、トリトン (T r i t o n)、ノニデット (N o n i d e t) P-40、ツイーン (T w e e n) 等が例示される。なかでも、ノニデット (N o n i d e t) P-40が最適である。これらの非イオン性界面活性剤は、たとえば0.5%の濃度で使用される。

- 5 処理は、原料細胞として例えばコムギ胚芽を使った場合、既知の手段でミル・浮選・篩の工程によって、胚芽抽出物を回収する。この胚芽抽出物に対して、混入している胚乳部分を排除するために、界面活性剤による洗浄を数回おこない、洗浄液が白濁しなくなるまで、洗浄を行う。この処理は、超音波処理との組合せでおこなうことがより好ましく、より完全な効果をうることができる。
- 10 かくして得られた胚芽抽出物は、トリチン等の内因性的特異的阻害物質を含む胚乳をほぼ完全に取り除かれ、胚芽は実質的に純化されていた。抗トリチン抗体を用いたイムノブロット法で、トリチンを指標として、超音波洗浄前後の胚乳タンパク質の混入度を検定したが、超音波洗浄によってトリチン含量が検出限度以下になっていることが確認された。このことから、該胚芽抽出物には胚乳タンパク質の混入
- 15 がほとんどなく、胚乳に局在する他のタンパク質合成不活性化因子であるチオニンやリボヌクレアーゼも胚芽抽出物から除去されていることが示された。また得られた胚芽抽出物は、リボソームが実質的に脱アデニン化されない程度に純化されており、リボソームの脱アデニン化率が7%未満、好ましくは1%以下になっていた。
- 20 2) (製剤安定化手段)
- 本発明の別の手段は、このようにして調製した無細胞タンパク質合成用細胞抽出物の製剤的安定化手段を導入することである。従来、無細胞タンパク質合成用細胞抽出物の保存方法は、前記のように-80~-196度摂氏近辺であったが、該手段の導入により、無細胞タンパク質合成用細胞抽出物を含有する製剤は室温で安定
- 25 に保存することができる。本発明製剤が室温保存可能な技術を達成したことは、産業上有用である。

無細胞タンパク質合成用細胞抽出物の安定化の手段は、製剤を乾燥製剤特に凍結乾燥の手段により製剤化をすることである。凍結乾燥は、自体公知の方法を利用できるが、例えば液体窒素により急速に無細胞タンパク質合成用細胞抽出物を凍結させる。乾燥は、例えば従来の凍結乾燥機を利用し3時間乾燥する。除水が完成し、  
5 得られた粉末状製剤は、真空又は窒素ガス雰囲気下で、封管され、製剤化がなされる。

前記製剤は、無論、前記本発明の手段が施された無細胞タンパク質合成用細胞抽出物単独で製剤化されてもよいが、所望により、無細胞タンパク質合成系に不可欠な物質、例えば合成基質、アミノ酸、エネルギー源等を選択して、添加後製剤化し  
10 てもよい。

製剤は、さらに所望により、無細胞タンパク質合成系の反応効率を高める物質、例えば各種イオン化合物、好ましくはカリウムイオン化合物、マグネシウムイオン化合物等を添加することができる。

製剤は、さらに、溶解性を高める物質例えば界面活性剤、前記リボソームの脱ア  
15 デニン化を防御する物質等を、所望により添加することができる。

製剤は、より好ましくは、無細胞タンパク質合成にあたって、単に水を添加することのみによって、反応の至適化が達成できる組成に調整されていることであるが、これは例えば製品をキット化することによって、要時混合して用いてもよい。無論、  
20 キット化にあたっては、無細胞タンパク質合成用細胞抽出物単独、無細胞タンパク質合成系に不可欠な物質、無細胞タンパク質合成系の反応効率を高める物質、さらに反応の至適化に適当な水溶液等を、選択してキット化できる。

### 3) (無細胞タンパク質合成手段：分子篩担体の利用)

別の本発明は、無細胞タンパク質合成系に用いる反応槽が、分子篩可能な担体によって調製されうる。この担体としては、分画分子量が10,000以下のものに  
25 適したものであれば特に限定されない。担体材料は、例えば多孔性ゲルろ過粒子で

あり、具体的にはセファデックスG 10からG 25等が例示される。担体は、水によって、調製してもよいが、より好ましくは緩衝液によって平衡化して使うことが好ましい。担体は、予め反応槽内に充填して調製してもよいし、要時調製できるように、反応槽と別々にキットとして調製してもよい。

- 5      反応槽は、クロマトグラフィー好ましくはカラムクロマトグラフィーが履行できるものであることが好ましい。カラム径、カラム長、担体ボリュームは、反応時間・展開速度との組合せによって、適宜調整できる。反応槽のボリュームは、目的タンパク質の合成量に応じて、適宜選択可能である。反応槽は、担体を事前充填し、所望により無細胞タンパク質合成系に関与する材料物質を担体中に分散させたものを調製するためには、要時開放可能な少なくとも2つの開口を担持したものが適当である。

- 15      反応槽に、担体を充填することは、要時若しくは事前に可能であるが、無細胞タンパク質合成系に関与する材料物質、特に合成基質例えばアミノ酸や、エネルギー源例えばATP、GTP、クレアチンリン酸、所望により添加する無細胞タンパク質合成反応効率を高めるイオン成分は、充填担体中に均一に、より好ましくは、これら物質の担体の移動相での展開と別途充填される無細胞タンパク質合成用細胞抽出物及び／又は翻訳鋳型物質の展開速度との関係を考慮した反応効率を計算し、最適の分散状態、特に局在的均一分散をおこなうことが望ましい。

- 20      ここで、所望により、担体は分子篩担体のみで構成し、別途、無細胞タンパク質合成用細胞抽出物、合成基質、エネルギー源、所望により無細胞タンパク質合成反応効率を高めるイオン成分を、適宜選択して事前調製した製剤を、要時、担体に充填し、翻訳鋳型物質を充填し、展開し、無細胞タンパク質合成をおこなうことも可能である。

- 25      分子篩可能な担体における、移動相の展開速度は、カラムのサイズや合成効率によって決定されるが、一般的には1時間当たり、カラム内容量の1/10～1/30である。展開に利用する溶液は、合成基質例えばアミノ酸や、エネルギー源例え

ばATP、GTP、クレアチンリン酸、所望により添加する無細胞タンパク質合成反応効率を高めるイオン成分を含む溶液であるが、必ずしも限定されない。また、展開は、好ましくは、自動制御されたものが望ましいが、必ずしも限定されない。

合成反応は、担体を充填した反応槽内で行うことが好ましい。しかし、充填条件  
5 を考慮すれば、担体上澄み中で、又はバッチによって反応をおこし、その後さらに担体展開中に合成反応をおこなうことも可能である。

本発明の合成反応は、リボソームのような無細胞タンパク質合成用細胞抽出物が移動相として移動し、合成反応により精製する副産物が分別的に展開されることで、分離除去され、同時に至適濃度の合成基質やエネルギー源、及び各種イオン等、翻訳反応に不可欠、あるいは同反応効率を高める化学物質の供給の下に、最大反応速度で合成が進行することが特徴である。  
10

本発明の手段は、無細胞タンパク質合成系に関与する材料物質の充填・展開・そして合成タンパク質の回収を、自動制御化して実施可能である。自動化は、所望により、工程単位ごとに制御できるが、より好ましくは、移動相の液展開速度が自動  
15 制御されていることである。

本発明の手段は、各種のイオン交換カラムやアフィニティークラム等、目的とするタンパク質に応じて自体公知の精製手段を連結することによって、大量のタンパク質を高純度で連続的に回収することが可能である。

かくして、上記に説明された本発明の手段を用いれば、目的とするタンパク質を  
20 効率的に製造する方法を提供可能である。

さらに、上記に説明された本発明の手段を用いれば、目的とする無細胞タンパク質合成用の装置を提供可能である。

さらに加えるに、上記に説明された本発明の手段を用いれば、目的とする無細胞タンパク質合成に適したセットからなるキットを提供可能である。

25

#### 4) 連続無細胞タンパク質合成手段（各要素の追加添加）



別の本発明は、無細胞タンパク質合成系に用いる各要素を追加添加することにより達成される。

本発明においては、反応開始後、要時又は継続的に、合成反応の鑄型となる mRNA を、原料として添加した mRNA の鑄型活性が低下傾向を示す前後に追加する。

- 5 添加は、所望により、極少量を継続的に添加してもよいし、一定期ごとに添加してもよい。添加量は、原料 mRNA 量の 10 分の 1 から同量程度である。この発明の特徴は、追加添加の効果をはじめて確認したことにより、添加量、添加時期については、合成効果の確認をもって、当業者が容易に変更・特定可能である。なお、他の要素についても同様であり、以下の記載で特に記述されていなくても同様の意味
- 10 である。

本発明においては、反応開始後、要時又は継続的に、エネルギー再生系酵素を、原料として添加したエネルギー再生系酵素活性が低下傾向を示す前後に追加する。添加は、所望により、極少量を継続的に添加してもよいし、一定期ごとに添加してもよい。添加量は、原料エネルギー再生系酵素量の 10 分の 1 から同量程度である。

- 15 エネルギー再生系酵素としては、クレアチンキナーゼが適当である。無論、本化合物と同様の機能を有する物質は同様にエネルギー再生系酵素として添加できる。その添加量・添加方法は、合成量をマーカーにして、要時変更可能である。

mRNA の追加添加とエネルギー再生系酵素の追加添加は、別々に行ってもよいがより好ましくは併用される。添加方法も、継続的あるいは断続的に行ってもよい。

- 20 その添加量・添加方法は、合成量を指標にして、要時変更可能である。

- 本発明は、前記 mRNA の追加添加及び／又はエネルギー再生系酵素の追加添加に加えて、所望により、基質及び／又はエネルギー源が枯渇することを防ぐ工程、及び／又は副生成物を排出する工程を導入することが出来る。基質、エネルギーとしては、各種アミノ酸、ATP、GTP などが連続的に又は断続的に追加供給され
- 25 ることが好ましい。その添加量としては、合成開始時の各物質の濃度あるいはほぼそれに近い濃度が維持されることが好ましい。しかし、この添加量もまた、合成効

果を指標にして要時、追加、変更可能である。

副生成物を排出するとは、AMPやGMP等の代謝産物及びリン酸やピロリン酸等の反応物を排出することであり、このような化合物は、継続的に又は断続的に反応系から排出されることが好ましい。

- 5 基質及び／又はエネルギー源が枯渇することを防ぐ工程、及び／又は副生成物を排出する工程としては、反応系の反応媒体を継続的又は断続的に、更新していくことが好ましい。本発明では、例えば、透析膜を使う方法を例示するが、その場合例えば透析外液を継続的又は断続的に更新又は交換していく。

- 10 以上のような各要素の追加・保存・交換・排出は、好ましくは自動化して処理する。自動化の手段は、自体公知のコンピュータシステムの制御下にある装置を準備し、各要素の追加・保存・交換・排出を一体化して行う。これらに、使用する各要素としての試薬類はキット化して調製されていることが好ましい。

#### 5) (自動連続無細胞タンパク質合成装置)

- 15 自動連続無細胞タンパク質合成装置は自体公知のコンピュータシステムの制御下にあり、各要素の追加・保存・交換・排出を一体化して行う機能に加えて、タンパク質合成に最も至適な環境を設定できる機能を併せ持つ。

- すなわち、複数の透析容器を、例えば15度摂氏より37度摂氏まで温度可変可能なそれぞれ独立した複数の、電子冷却装置とヒーターとからなるチャンバーに入  
20 れることで所望の温度に設定でき、目的とするタンパク質の合成に最も至適な温度を維持することができる。

- また、透析容器の透析外液を継続的又は断続的に更新又は交換していく方法として、例えば連続可変若しくは断続的にペリスターポンプ若しくはシリンジポンプ等の分注装置を用い、透析外液の更新又は交換の速度を例えば、0.1～1 mL/時  
25 間の間で可変とすることにより、目的とするタンパク質の合成に最も至適な条件を選定することができる。

さらに、鋳型mRNA及びエネルギー再生系酵素であるクレアチンキナーゼ等のタンパク質合成に必要な物質を、複数の透析容器中に設置されるタンパク質合成反応系部分に、所望の時間毎に、例えば6時間～15時間の間隔を置いて、所望の量を追加添加できる。

- 5      上記装置において、鋳型mRNA、エネルギー再生系酵素基質、エネルギー源、透析外液等の各要素は、個別に又は混合されて、透析容器に接続された貯蔵容器に保存され、貯蔵容器とタンパク質合成反応系部分又は透析容器とを連結する流路を通じて供給される。この貯蔵容器は好ましくは4度摂氏に維持される。

10      6) (連続無細胞タンパク質合成装置の構成)

本発明の具体化のための連続無細胞タンパク質合成系に使用する装置の一例として、カートリッジ装置を説明する。但し、本発明の装置は、必ずしもカートリッジ式である必要はない。

- 15      カートリッジ装置は、一般に有底中空体である含浸槽とこれに密封可能に装着される蓋部とを含む構成からなる連続無細胞タンパク質合成装置である。該装置は基質及び／又はエネルギー源の導入手段である入口と透析外液の含浸槽内の液室につながる出口をもつ流路、透析外液中の代謝産物等の排出手段である含浸槽内の液室に存する入口と外部につながる出口をもつ流路、mRNA及び／又はエネルギー再生系酵素の導入手段である入口と透析外液の含浸槽内の液室に存する透析膜の機能
- 20      機能を有する媒体を担持する。以下、図をもって本発明のカートリッジ装置を詳細に説明するが、図示した装置は実施の一態様であり、これに限定されるものではない。

- 25      カートリッジ装置は、一般に有底中空体である含浸槽1とこれに密封可能に装着される蓋部2を含み、含浸槽1内には透析外液3が液面4まで満たされる。さらに詳しくは、エネルギー源等の導入手段である入口5と透析外液3の含浸槽1内の液室につながる出口6をもつ流路7、透析外液3中の代謝産物等の排出手段である含

浸槽 1 内の液室に存する入口 8 と外部につながる出口 9 及び／又は 9 a をもつ流  
路 10、及び合成系物質の導入手段である入口 11 と透析外液 3 の含浸槽 1 内の液  
室に存する透析膜の機能を有する媒体 12 を基本的な構成として担持する。実施の  
一態様として、第 5 図及び第 6 図には含浸槽が円筒体であるカートリッジ装置を示  
したが、含浸槽の形は円筒体に限らない。

ここにおいて、出口 6 は、透析外液 3 と液中において連絡しており、出口 6 の端  
部は、含浸槽 1 の上半分に位置し、少なくとも液面 4 より下部に位置する。入口  
8 は、透析外液 3 と液中において連絡しており、入口 8 の端部は、含浸槽 1 の下半  
分に位置する。出口 6 の端部の位置と入口 8 の端部の位置は、上下が逆転してい  
ても良い。

出口 9 a と導入部 20 a は、液面 4 と同部位に接しかつ液面 4 より上部に位置す  
る。出口 9 a と導入部 20 a により、排出は自然流出が可能となる。なお、透析外  
液 3 中の代謝産物等の排出を出口 9 とその導入部 20 を介して行う場合は、出口 9  
a とその導入部 20 a を閉鎖するか、あるいは成形時に出口 9 a とその導入部 20  
a を付加しないで成形したものを使用することもできる。また、透析外液 3 中の代  
謝産物等の排出を出口 9 a とその導入部 20 a を介して自然排出する場合は、出口  
9 とその導入部 20 を閉鎖するか、あるいは成形時に出口 9 と導入部 20 を付加し  
ないで成形したものを使用することもできる。さらにこの場合、図示していないが、  
出口 9 a の導入部 20 a と入口 8 の導入部 19 とが接続可能になるように、導入部  
19 及び導入部 20 a を成形して使用することもできる。この成形時、入口 8 の導  
入部 19 は、出口 9 側の端部を蓋部に接続せず、出口 9 a の導入部 20 a に接続可  
能なように成形しても良い。

透析膜機能を有する媒体 12 は、入口 11 の導入部 13 と一体成形されていても  
よいが、例示するように留め具 14 によって、固接されていてもよい。媒体 12 は、  
少なくとも透析外液 3 中に浸漬されるように含浸槽 1 内に位置付けて設置される。  
媒体 12 の入口 11 につながる方向とは逆の端部は、少なくとも透析外液 3 中に浸

漬されるように含浸槽 1 内に位置付けて設置され、少なくとも閉鎖されておれば十分であり、一具体例としては、膜端部 15 のように蓋形状のものによって閉鎖するか、又は媒体 12 を口部が一つの袋状のものとして用いてもよい。

カートリッジ装置には、好ましくは透析外液 3 の攪拌をする手段を導入してもよい。一具体例としては、マグネティックスターラー 16 のような回転媒体を含浸槽 1 内においてもよい。

含浸槽 1 は、恒温化を施すことが、合成効率のためには好ましく、所望の恒温化手段との併用が可能である。例えば、恒温槽に設置可能なように、含浸槽 1 は調整できる。カートリッジ装置は、通常は透析外液 3 及び合成系物質が浸漬のない状態で使用者に提供され、使用者が所望により随時入口 11、入口 5 から各々流入させることによって浸漬される。

入口 5、出口 9、入口 11 は、その流出入について自動化制御する手段が導入されることが好ましい。但し、より簡易な自動化手段としては、入口 5 から出口 6、そして入口 8 から出口 9 の流出入系が液面 4 を一定に保つべく自動制御されることが好ましい。この場合、入口 11 からの物質の追加添加は、手動制御により行ってもよい。また、出口 9 a 及び導入部 20 a が、液面 4 より上部であってかつ液面に接した部位に設置された場合には、自然流出が可能である。

本カートリッジ装置は、事前組立て装置であってもよいし、要時組立ての装置であってもよい。要時組立ての場合は、含浸槽 1、含浸槽 1 の蓋部 2、入口 11 の導入部 13、入口 5 の導入部 17、出口 6 の導入部 18、入口 8 の導入部 19、出口 9 の導入部 20、媒体 12（導入部 13 と事前成形してもよい）を個々に用意し、各々の接続は、例えばテーパー手段によって行う。

カートリッジ装置の材質は、広く公知のプラスチック材料が利用できる。

## 25 実施例

以下、本発明をコムギ胚芽を使用した無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製

剤についての実施例によりさらに具体的に説明するが、下記の実施例は本発明についての具体的認識を得る一助とみなすべきものであり、本発明の範囲は下記の実施例により何ら限定されるものではない。

## 5 実施例 1

(コムギ胚芽抽出物の調製)

ミル、浮選、篩を用いる種子からの無傷胚芽（発芽能を有する）の単離方法は Johnstonらの方法（Johnston, F. B. et al. (1957) Nature, 179, 160-161）を改良して用いた。北海道産のチホクコムギ種子（未消毒）を1分間に100gの割合でミル（Fritsch社製Rotor Speed Mill pulverisette 14型）に添加し、回転数8,000rpmで種子を温和に破碎した。これを再度6,000rpmで破碎し、篩で粗胚芽画分（メッシュサイズ0.71mm～1.00mm）を得た後、四塩化炭素とシクロヘキサン混液（四塩化炭素：シクロヘキサン＝2.5：1）を用いた浮選によって、発芽能を有する胚芽を浮上画分から回収し、室温乾燥によって有機溶媒を除去した。この胚芽画分に混在する種皮等の不純物をポリエチレン板などの静電気帯電体を用いて吸着除去した。

さらに胚芽粒子を篩と静電気帯電体を用いて、小粒（0.71mm～0.85mm）、中粒（0.85mm～1mm）、軽粒（0.85mm～1mmで且つ軽量）の3画分に分別し、最後に目による分別を行った。小粒画分が最も高いタンパク質合成活性を示した。軽粒は、種子破碎時に胚芽に生じた小傷胚芽が浮選操作中に破壊が進行したものであると推察される。次に、この試料からコムギ胚乳成分を完全に除去するため、ガーゼにコムギ胚芽を入れ、冷却しながら冷蒸留水（DDW）で洗浄し、非イオン性界面活性剤であるNP-40の0.5%溶液に懸濁し、超音波洗浄器を用いて、洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄を繰り返した。蒸留水の存在下に再度1回の超音波洗浄後、吸引ろ過によってコムギ胚芽をとり、それを冷蒸留水（D

DW) で何度も洗浄し、コムギ胚芽を純化した。

コムギ胚芽抽出物の調製は常法 (Erickson, A. H. et al. (1996) *Methods in Enzymol.*, 96, 38-50) に準じた。以下の操作は4度摂氏で行う。液体窒素で凍結した純化コムギ胚芽を乳鉢中で粉碎し、得た粉体1g当たり、1mlのPattersonらの方法を一部改変した抽出溶液 (80mM HEPES-KOH, pH7.8、200mM 酢酸カリウム、2mM 酢酸マグネシウム、4mM 塩化カルシウム、8mM ジチオスレイトール、各0.6mM L型アミノ酸20種類、各1 $\mu$ Mのタンパク質分解酵素阻害剤であるFUT、E-64、PMSFを含む) を加えて、泡が発生しないように注意しながら攪拌した。30,000g、15分間の遠心によって得られる上清を胚芽抽出物として回収し、あらかじめ溶液 (40mM HEPES-KOH, pH7.8、100mM 酢酸カリウム、5mM 酢酸マグネシウム、4mM ジチオスレイトール) で平衡化しておいたセファデックスG-25カラム (Coarse) でゲル濾過を行った。試料の濃度を、170~250A260nm (A260/A280=1.5) に調整した。

このようにして調製された製剤の脱アデニン化率は、複数回の実施において、全て1%以下であり、0.01~0.3%の結果が得られた (脱アデニン化率の測定は、酸性下アニリン処理による脱離法を用いて行った: Endo, Y. et al. (1987) *J. Biol. Chem.*, 262, 5908-5912、Yoshinari, S. et al. (1996) *Eur. J. Biochem.*, 242, 585-591)。また、トリチンの夾雑量を、抗トリチン抗体を用いたイムノブロット法で検定したが、検出限度以下であった。

## 実施例2

### 25 (透析法による連続式コムギ胚芽無細胞タンパク質合成)

連続式コムギ胚芽無細胞タンパク質合成の方法は既報 (Endo, Y. et al.

1. (1992) J. Biotech., 25, 221-230) 上記実施例1の反応溶液をデイスポダイライザー (Spectra/Por<sup>®</sup>CE, MWCO: 25k, volume: 0.5ml) に入れ、反応液の10倍容量の透析外液 (20mM HEPES-KOH, pH7.6、95mM 酢酸カリウム、2.65mM 酢酸マグネシウム、4mM ジチオスレイトール、1.2mM ATP、0.25mM GTP、16mM クレアチンリン酸、0.38mM スペルミジン、L型アミノ酸20種類 (各0.3mM)、0.005%NaN<sub>3</sub>、0.05%NP-40、E-64、PMSF各1mM) に対しての透析系で、反応は摂氏20度で行った。

10 以上の方法で得た条件の下に、コムギ胚芽連続式無細胞タンパク質合成を試みたところ、分子量5,000~130,000の種々のタンパク質を効率良く合成することができ、合成効率は反応容量1ml当たり0.3~1.8mgであった (表1)。

表1 コムギ胚芽無細胞系 (透析系) で合成したタンパク質種の合成量と性質

15

①DHFR (20kDa) 1.8mg/ml (活性あり)

②人ミトコンドリアルMet-tRNA synthetase (84kDa)

1.3mg/ml (活性なし・抗体作成用抗原)

③Luciferase (60kDa)

20

0.7mg/ml (活性あり)

④Green fluorescent protein (27kDa)

0.4mg/ml (活性あり)

⑤人RNA helicase A (130kDa)

0.3mg/ml (活性なし・抗体作成用抗原)

25

⑥Proteasome Activator Protein  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  (各28、28、31kDa)



各 0.5 mg/ml (活性なし・抗体作成用抗原)

なお、上記実施例において、タンパク質合成活性の分析方法は、遠藤らの既報の記載に従って行った。また、 $^{14}\text{C}$ -ロイシンのタンパク質への取り込み測定法、

5 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による合成タンパク質の分離とクマシーブリリアントブルーによる染色法、及び、蔗糖密度勾配遠心法によるポリリボソームパターン分析法は遠藤らの論文 (Endo, Y. et al. (1992) J. Biotech., 25, 221-230、Endo, Y. et al. (1975) Biochim. Biophys. Acta, 383, 305-315) の記載に

10 従って行った。

### 実施例 3

(コムギ胚芽抽出物の製剤化)

実施例 1 に記載した方法で得たコムギ胚芽抽出物を液体窒素で凍結後、通常の凍結乾燥機 (Labconco Freeze Dry System Freezone 4.5) を用いて 3 時間の運転で除水した。調製した粉末状の試料は、その成分が化学変化しないように 2 種の方法、真空及び窒素ガス充填下に封管して保存した。

15

### 20 実施例 4

(タンパク質合成効果の確認)

上記実施例 3 の方法で凍結乾燥し製剤化した本発明からなるコムギ胚芽抽出物含有製剤を  $-80$  度摂氏で 2 ヶ月間保存したものと、凍結乾燥していないコムギ胚芽抽出物を液体窒素中 ( $-196$  度摂氏) で 2 ヶ月間保存したものとの、タンパク質合成活性の比較を行った。

25

各コムギ胚芽抽出物に、Ericssonらの方法に準じた成分組成である、3

0 mM HEPES-KOH, pH 7.6, 95 mM 酢酸カリウム、2.65 mM 酢酸マグネシウム、2.85 mM ジチオスレイトール、0.5 mg/ml クレアチンキナーゼ、1.2 mM ATP、0.25 mM GTP、16 mM クレアチンリン酸、0.380 mM スペルミジン、20種類のL型アミノ酸（各0.3 mM）を加えた。さらに、1,000 units/ml リボヌクレアーゼ阻害剤（RNasin）とNP-40（終濃度0.05%）を添加した後、既に発明者が文献報告した方法（Endo, Y. et al., (1992) J. Biotech., 25, 221-230）で調製したCAP付きジヒドロ葉酸還元酵素（dihydrofolate reductase）mRNA（80  $\mu$ g/ml 反応容量）と50  $\mu$ Ci（ml 反応容量当たり）の[U- $^{14}$ C]-ロイシン（leucine）（166 mCi/mmol）を添加し、タンパク質合成活性を[U- $^{14}$ C]-ロイシンのタンパク質への取込を指標に測定した。反応は摂氏20～30度で行った。

第1図に示したように、凍結乾燥したコムギ抽出物含有製剤（■—■）を室温—80度摂氏で2ヶ月間保存した後においても、従来の液体窒素保存（□—□）と同等なタンパク質合成活性を保持していた。また、凍結乾燥後における保存温度について検討したところ、保存期間1ヶ月後におけるタンパク質合成活性で比較した場合、—80度摂氏（●—●）が最も安定であったが、4度摂氏（■—■）または室温（□—□）での保存でも、タンパク質合成活性は十分に保持されていた（第2図）。

すなわち、本発明の手段を適用して、無細胞タンパク質合成用細胞抽出物を、従来の保存温度より高い温度である—80度摂氏～室温で、高品質を維持しながら保存および供給することが可能である。

## 25 実施例 5

（無細胞タンパク質合成コムギ胚芽抽出物含有製剤の調製）

反応液は、容量の20～60%の、実施例1に記載の方法で調製したコムギ胚芽抽出物を含み、上記Ericksonらの方法に準じた以下の成分組成である、30mM HEPES-KOH, pH7.6、95mM 酢酸カリウム、2.65mM 酢酸マグネシウム、2.85mM ジチオスレイトール、0.5mg/ml クレアチンキナーゼ、1.2mM ATP、0.25mM GTP、16mM クレアチンリン酸、0.380mM スペルミジン、20種類のL型アミノ酸（各0.3mM）を添加した後、液体窒素で凍結し、通常の凍結乾燥機で除水した。調製した粉末状の試料は、その成分が化学変化しないように真空または窒素ガス充填下に封管して保存した。

10

#### 実施例6

##### （タンパク質合成活性の測定）

本発明からなる実施例5の方法で調製した無細胞タンパク質合成コムギ胚芽抽出物含有製剤を-80度摂氏で2ヶ月間保存したものと、同期間液体窒素中（-196度摂氏）に保存した既存法で調製したコムギ胚芽抽出物に実施例5に記したEricksonらの方法に準じた成分組成の物質を添加した無細胞タンパク質合成コムギ胚芽抽出物との、タンパク質合成活性を比較した。各溶液に、さらに1,000units/ml リボヌクレアーゼ阻害剤（RNasin）とNP-40（終濃度0.05%）を添加した後、タンパク質合成活性の測定を実施例4に記載した方法で行った。図3に示したように、本発明の凍結乾燥した無細胞タンパク質合成コムギ胚芽抽出物含有製剤（□—□）は、従来法で調製し液体窒素保存（■—■）したものと同等なタンパク質合成活性を保持していた。

すなわち、本発明の手段を適用することにより、無細胞タンパク質合成用細胞抽出物を含む製剤を、従来の保存温度より高い温度である-80度摂氏～室温で、高品質を維持しながら安定に保存、供給することができ、さらに無細胞タンパク質合成系の作業工程を簡便化する方法を提供することが可能である。

25

## 実施例 7

(ゲルろ過カラムクロマトを反応槽とするコムギ胚芽連続式無細胞タンパク質合成：手動オープンカラム法)

ゲルろ過担体として、ファルマシア社製セファデックスG-25 (fine) を  
5 膨潤させた後、下記の成分組成である緩衝液 (20 mM HEPES-KOH, pH 7.6、95 mM 酢酸カリウム、2.65 mM 酢酸マグネシウム、4 mM ジチオスレイトール、1.2 mM ATP、0.25 mM GTP、16 mM クレアチンリン酸、0.380 mM スペルミジン、20種類のL型アミノ酸 (各0.3 mM)、0.005% NaN<sub>3</sub>、0.05% NP-40、E-64、PMSF  
10 (各1 mM)) でカラムを平衡化し、カラム (内径10 mm、長さ100 mm) に詰めた。

このカラムに、実施例1に記載した方法で調製した無細胞タンパク質合成反応溶液0.1 ml (翻訳鋳型として5' CAP付きのジヒドロ葉酸還元酵素mRNAを反応液1 ml 当たり、80 µg含む) を重層し、23度摂氏で1時間保温の後、ア  
15 ミノ酸、エネルギー源等合成に必要な成分をペリスタポンプを用いて、1時間当たり0.5 ml の流速で連続的に供給した。反応12時間後の試料1 µl を12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に付し、タンパク質を分離後、クマシーブリリアントブルーで染色し、更に、合成されたタンパク質の定量をデンストメーターによって行った (Endo, Y. et al., (1992) J. Biotech  
20 h., 25, 221-230, Endo, Y. et al., (1975) Biochim. Biophys. Acta, 383, 305-315)。

結果は、第4A図に示した。レーン1は鋳型非存在下、レーン3はカラム法で12時間合成した結果である。左のレーンは分子量マーカーで、上から、94 kDa、67 kDa、43 kDa、30 kDa、20.1 kDaである。矢印は合成された  
25 ジヒドロ葉酸還元酵素を示す。

## 実施例 8

(ゲルろ過カラムクロマトを反応槽とするコムギ胚芽連続式無細胞タンパク質合成：液体クロマト装置)

ファルマシア社製セファデックスG-25 (fine) をゲルろ過担体とするカ  
5 ラム (HR10/30、内径10mm、長さ300mm) を使用し、ファルマシア  
バイオテック SMART<sup>®</sup> System 液体クロマト装置を利用し、反応容量を0.  
3ml とした以外は、反応液組成、反応方法、分析方法すべて、実施例1 と同様  
に行った。結果は第4B図のレーン2に示した。

比較例として、透析法を用いる連続式コムギ胚芽無細胞タンパク質合成を検討し  
10 た。実施例1に記載した方法で調製した無細胞タンパク質合成用反応液をディスポ  
ダイライザー (Spectra/Por<sup>®</sup> CE、MWCO: 25k、volume : 0.5ml) に入れ、反応液の10倍容量の透析外液 (20mM HEPES  
-KOH, pH7.6、95mM 酢酸カリウム、2.65mM 酢酸マグネシウ  
ム、4mM ジチオスレイトール、1.2mM ATP、0.25mM GTP、  
15 16mM クレアチンリン酸、0.380mM スペルミジン、20種類のL型ア  
ミノ酸 (各0.3mM)、0.005% NaN<sub>3</sub>、0.05% NP-40、E-  
64、PMSF各1mM) に対しての透析系で、反応は摂氏23~30度で12時  
間おこなった。結果は第4A図のレーン2および第4B図のレーン1に示した。

第4図に示したように、カラム法によって、モデルとして用いたジヒドロ葉酸還  
20 元酵素を透析法と同様な合成収量 (0.25mg/ml 反応容量) で生産できるこ  
とが、手動オープンカラム法と液体クロマト装置を用いる両方法で実験的に確認さ  
れた。カラムサイズを増大させることによって、タンパク質の大量生産が可能であ  
る。

## 25 実施例 9

(mRNA及びクレアチンキナーゼの追加による反応維持時間の延長による合成

の効率化)

モデルとしてジヒドロ葉酸還元酵素をコードするmRNAを用い、24時間合成反応を行った。反応溶液は、容量の48%の実施例1でえたコムギ胚芽抽出物を含み、上記Ericksonらの方法に準じた以下の成分組成である、1,000 units/ml リボヌクレアーゼ阻害剤 (RNasin)、30mM HEPES-KOH pH7.6、95mM 酢酸カリウム、2.65mM 酢酸マグネシウム、2.85mM ジチオスレイトール、0.5mg/ml クレアチンキナーゼ、1.2mM ATP、0.25mM GTP、16mM クレアチンリン酸、0.380mM スペルミジン、20種類のL型アミノ酸 (各0.3mM)、0.05% NP-40の他、既に報告した方法 (Endo, Y. et al. (1992) J. Biotech., 25, 221-230) で調製したCAP付きのジヒドロ葉酸還元酵素 (dihydrofolate reductase) をコードするmRNA (80  $\mu$ g/ml 反応容量) を含む。

反応溶液を、その20倍容量の透析外液 (20mM HEPES-KOH pH7.6、95mM 酢酸カリウム、2.65mM 酢酸マグネシウム、4mM ジチオスレイトール、1.2mM ATP、0.25mM GTP、16mM クレアチンリン酸、0.380mM スペルミジン、20種類のL型アミノ酸 (各0.3mM)、0.005%  $\text{NaN}_3$ 、0.05% NP-40、E-64、PMSF 各1mM) に対する透析系を用いて、23度摂氏で反応させた。

反応開始12時間後に、1mlの反応容量当たり20  $\mu$ gのCAP付きのジヒドロ葉酸還元酵素をコードするmRNAと、1mlの反応容量当たり200  $\mu$ gのクレアチンキナーゼとを追加添加、又は1mlの反応容量当たり20  $\mu$ gのCAP付きのジヒドロ葉酸還元酵素をコードするmRNAのみを追加添加、若しくは1mlの反応容量当たり200  $\mu$ gのクレアチンキナーゼのみを追加添加した。比較対照として、両物質とも追加添加せず、反応を行った。操作は手動で行い、透析外液の交換はしなかった。合成タンパク質量はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

後に、タンパク質をクマシーブルー染色し、デンストメーターを用いてその染色バンド強度と標準品との比から求めた (Endo, Y. et al. (1992) J. Biotech., 25, 221-230, Endo, Y. et al. (1995) Biochim. Biophys. Acta, 383, 305-315)。

- 5 第7図に示すように、反応開始12時間後(矢印)におけるmRNA及びクレアチンキナーゼの追加添加(○-○)によって合成反応がほぼ直線的に持続することがわかる。いずれか一方のみの追加添加(△-△)(▽-▽)では、追加添加しない(□-□)と同様に反応が停止した。すなわち、上記で示した可能性(mRNAの鋳型活性低下と、クレアチンキナーゼ活性の低下によるエネルギー源の枯渇とに
- 10 起因するタンパク質合成反応の停止)がここで実験的に確認され、その解決方法も完成した。

#### 実施例10

(透析外液の経時的交換による反応維持時間の延長による合成の効率化)

- 15 モデルとしてジヒドロ葉酸還元酵素をコードするmRNAを用い、反応液組成、温度等の条件は実施例9と同様とし、反応開始後24時間及び45時間に透析外液を交換して、60時間タンパク質合成を行った。比較対照として、透析外液を交換しないでタンパク質合成を行った。いずれの反応系にも、1mlの反応容量当たり
- 20 20 $\mu$ gのCAP付きのジヒドロ葉酸還元酵素をコードするmRNAと、1mlの反応容量当たり200 $\mu$ gのクレアチンキナーゼとを追加添加した。合成タンパク質量は実施例9に記載した方法によって測定した。

- 第8図に示すように、透析外液交換なし(△-△)では24時間まではほぼ直線的に合成が進行するものの、30時間程度で反応速度が極端に低下する。しかし、24時間毎(矢印)に透析外液を交換することにより(○-○)、タンパク質合成が
- 25 少なくとも60時間まで持続した。すなわち、上記で示した可能性(タンパク質合成に必須な原料の枯渇と副生成物の蓄積によるタンパク質合成反応の停止)がここ

で実験的に確認され、その解決方法も完成した。

### 実施例 1 1

(自動連続無細胞タンパク質合成装置を用いた mRNA 及びクレアチンキナーゼ  
5 の自動追加及び透析外液の自動交換による、反応維持時間の延長と合成の効率化)  
モデルとしてジヒドロ葉酸還元酵素をコードする mRNA を用い、反応液組成、  
温度等の条件は実施例 9 と同様とし、自動連続無細胞タンパク質合成装置を用いて  
タンパク質合成を 60 時間行った。反応開始 12 時間毎に、別々に 4 度摂氏に保存  
しておいた 1 ml 反応容量当たり 20  $\mu$ g の CAP 付きのジヒドロ葉酸還元酵素  
10 をコードする mRNA 及び 1 ml 反応容量当たり 200  $\mu$ g のクレアチンキナー  
ゼを、それぞれ 5  $\mu$ l ずつ追加添加して反応させた。透析外液は、4 度摂氏に維持  
した貯蔵容器から、透析容器に連続的に供給 (0.3 ml/時間) し、同流速で透  
析容器から排出させた。開始反応溶液量 (0.5 ml) に対して 1  $\mu$ l 相当量の反  
応溶液を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後に、タンパク質をクマシーブ  
15 ルー染色した (第 9 図 (A))。比較対照として、CAP 付きのジヒドロ葉酸還元酵  
素をコードする mRNA を追加添加せずクレアチンキナーゼのみを追加添加し、上  
記同様の方法でタンパク質の合成を行った (第 9 図 (B))。また、反応 0 時間の試  
料 1  $\mu$ l にジヒドロ葉酸還元酵素標品 1  $\mu$ g を添加して同様に泳動・染色した (第  
9 図 (A) 右レーン)。合成タンパク質量は実施例 9 に記載した方法で測定した (第  
20 9 図 (C))。

第 9 図に示すように、CAP 付きのジヒドロ葉酸還元酵素をコードする mRNA  
を追加添加せずクレアチンキナーゼのみを追加添加した ( $\Delta$ - $\Delta$ ) 場合、反応が 1  
5 時間程度で停止した。図示していないが、クレアチンキナーゼを追加せず CAP  
付きのジヒドロ葉酸還元酵素をコードする mRNA のみを追加添加した場合にも  
25 同様に反応の停止が観察された。一方、12 時間毎の CAP 付きのジヒドロ葉酸還  
元酵素をコードする mRNA 及びクレアチンキナーゼの自動追加と 24 時間目の



透析外液の自動交換（○－○）とによって、無細胞タンパク質合成が自動的に効率よく進行した。すなわち、本装置が有効に機能していることが確認できた。

#### 産業上の利用可能性

- 5      本発明の製剤は、（１）無細胞タンパク質合成用細胞抽出物の保存に超低温槽やドライアイス等を用いる低温輸送の必要無しに、長期にわたって高品質管理が可能となる。（２）無細胞タンパク質合成用細胞抽出物とアミノ酸やＡＴＰ等の合成基質、及び各種イオン等、翻訳反応に不可欠、あるいは同反応効率を高める化学物質をあらかじめ混合して調製した本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有
- 10   製剤をそのまま凍結乾燥することによって、タンパク質合成の高活性を有したままの形で容易に保存・輸送が可能である。

- 本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤は、生体外でのタンパク質合成にあたって反応混液の調製を必要とせず、基本的には水と、目的とする翻訳鋳型（ｍＲＮＡ）を添加するだけで、遺伝子産物の同定やその多量合成やその翻訳機
- 15   構の解析が手軽にできる手段を提供するものである。

- 本発明により、無細胞タンパク質合成系に必要な、無細胞タンパク質合成用細胞抽出物、翻訳鋳型を除いた他の合成基質やエネルギー源、及び各種イオン等、の翻訳反応に不可欠、あるいは同反応効率を高める化学物質を含む、無細胞タンパク質合成反応系に関与する物質のように常温では不安定な物質を、安定に保存および供
- 20   給することが可能になり、これらの物質を長期にわたって高品質管理することが可能になった。また、本発明の凍結乾燥した無細胞タンパク質合成用細胞抽出物を含む製剤を提供することにより、無細胞タンパク質合成系の取り扱いが従来より容易になり、さらに反応液を調製する必要がないため、作業工程が短縮され、該無細胞タンパク質合成系の産業上の有用性が向上した。

- 25   別の本発明の手段は、無細胞タンパク質合成用の反応槽の担体として分子篩の原理を応用することにより、従来の膜を使用した連続式無細胞タンパク質合成法では

難しかった大容量の無細胞タンパク質合成が可能となった。

さらに、別の本発明の手段は、透析式の自動連続タンパク質合成装置が発明され、タンパク質の合成が簡便化された。

## 請 求 の 範 囲

1. 生物体から、自己のタンパク質合成反応の阻害に関与する系を実質的に排除することによって調製した無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。
- 5 2. 請求の範囲第1項記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物を含む物質を、室温保存可能であって、該細胞抽出物の生物学的機能を維持した状態の製剤に調製したことを特徴とする無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。
3. 製剤が、乾燥製剤である請求の範囲第2項に記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。
- 10 4. 製剤化が、凍結乾燥処理によっておこなわれる請求の範囲第3項に記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。
5. 細胞抽出物を利用した無細胞タンパク質合成系の合成系反応に不可欠な物質を添加、又は合成系反応に不可欠な物質と合成系反応の効率を高める物質を添加して製剤化をおこなうことを特徴とする請求の範囲第2～4項のいずれかに記載の無
- 15 細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。
6. 合成系反応に不可欠な物質が、合成基質およびエネルギー源である請求の範囲第5項に記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。
7. 合成系反応の効率を高める物質が、カリウムイオン化合物、マグネシウムイオン化合物である請求の範囲第5項又は第6項に記載の無細胞タンパク質合成用細胞
- 20 抽出物含有製剤。
8. 要時、水溶液への溶解性を容易化する物質を添加した請求の範囲第5～7項のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。
9. 生物体が、胚芽である請求の範囲第1～8項のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。
- 25 10. 自己のタンパク質合成反応の阻害に関与する系を実質的に排除することによって調製した無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤であって、胚芽抽出物が

ら該胚芽抽出物に混入する胚乳を完全に除去することを特徴とする請求項 9 に記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。

1 1. 自己のタンパク質合成反応の阻害に関与する系を排除する方法が、非イオン性界面活性剤を用いて、胚芽抽出物进行处理することを特徴とする請求の範囲第 1 0 5 項に記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。

1 2. 非イオン性界面活性剤を用いて、胚芽抽出物进行处理する方法が、超音波処理により、洗浄液が白濁しなくなるまでおこなうことを特徴とする請求の範囲第 1 1 項に記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。

1 3. 自己のタンパク質合成反応の阻害に関与する系が、リボソーム不活性化タンパク質である請求の範囲第 1 ～ 1 2 項のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。

1 4. リボソーム不活性化タンパク質が、トリチンである請求の範囲第 1 3 項に記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。

1 5. 自己のタンパク質合成反応の阻害に関与する系を排除することが、リボソームの脱アデニン化を制御することである請求の範囲第 1 ～ 1 4 項のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。

1 6. 自己のタンパク質合成反応の阻害に関与する系を排除するために、リボソームの脱アデニン化を制御する物質を添加する請求の範囲第 1 5 項に記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。

20 1 7. 非イオン性界面活性剤と、リボソームの脱アデニン化を制御する物質を添加することによって胚芽进行处理する請求の範囲第 9 ～ 1 5 項のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。

25 1 8. 請求の範囲第 1 ～ 1 7 項のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤を用いる無細胞タンパク質合成系において、該合成系に用いる反応槽が分子篩可能な担体によって調製され、無細胞タンパク質合成系に関与する材料物質が該担体を移動相として展開され、展開中に無細胞タンパク質合成反応が実行さ

れ、その結果として、合成タンパク質を回収することが可能な無細胞タンパク質合成手段。

19. 請求の範囲第1～17項のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤を用いる無細胞タンパク質合成系において、該合成系に用いる反応槽  
5 が透析手段によって調製され、無細胞タンパク質合成系に關与する材料物質と無細胞タンパク質合成反応産物が透析膜を介して分離され、合成タンパク質を回収することが可能な無細胞タンパク質合成手段。

20. 請求の範囲第18項又は第19項に記載の無細胞タンパク質合成手段において、少なくとも合成反応の鋳型となるmRNA、エネルギー再生系酵素、基質、エ  
10 ネルギー源から選ばれた要素について追加・保存・交換・排出から選択される処置を導入する連続無細胞タンパク質合成手段。

21. 請求項18～20のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成手段を利用して產生される蛋白質。

22. 含浸槽とこれに密封可能に装着される蓋部とを含む構成からなる、請求の範囲第1～17項のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤  
15 を用いる連続無細胞タンパク質合成装置であって、該装置に基質及び／又はエネルギー源の導入手段である入口と透析外液の含浸槽内の液室につながる出口をもつ流路、透析外液中の代謝産物等の排出手段である含浸槽内の液室に存する入口と外部につながる出口をもつ流路、mRNA及び／又はエネルギー再生系酵素の導入手段  
20 である入口と透析外液の含浸槽内の液室に存する透析膜の機能を有する媒体を担持する装置。

[1999年11月22日(22.11.99)国際事務局受理:出願当初の請求の範囲,  
2-11, 13-17及び21は取り下げられた;出願当初の請求の範囲1, 12,  
18-20及び22は補正された;他の請求の範囲は変更なし。(3頁)]

1. (補正後)小麦胚芽から胚乳成分の夾雑を完全に除去するために、小麦胚芽を非イオン性界面活性剤で洗浄する工程を含む処理をなしてえられる小麦胚芽抽出物を含有する無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤であって、この小麦胚芽抽出物の脱アデニン化率が1%以下であり、この小麦胚芽抽出物の乾燥製剤が室温保存も可とする安定性を保持し、この小麦胚芽抽出物を使用したタンパク質合成基質等の補充を伴う連続無細胞タンパク質合成において少なくとも合成開始後24時間目においても定常的な合成能を有し、さらに24時間目において少なくとも1mg/ml以上の合成量をもつ、無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。
2. (削除)
3. (削除)
- 15 4. (削除)
5. (削除)
6. (削除)
7. (削除)
8. (削除)
- 20 9. (削除)
10. (削除)
11. (削除)
12. (補正後)非イオン性界面活性剤を用いて、胚芽抽出物をえる方法が、超音波処理により、洗浄液が白濁しなくなるまでおこなうことを特徴とする請求の範囲1項の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。
- 25 13. (削除)

14. (削除)
15. (削除)
16. (削除)
17. (削除)
- 5 18. (補正後)請求の範囲1項または12項のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤を用いる無細胞タンパク質合成系において、該合成系に用いる反応槽が分子篩可能な担体によって調製され、無細胞タンパク質合成系に関与する材料物質が該担体を移動相として展開され、展開中に無細胞タンパク質合成反応が実行され、その結果
- 10 として、合成タンパク質を回収することが可能な無細胞タンパク質合成手段。
19. (補正後)請求の範囲1項または12項のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤を用いる無細胞タンパク質合成系において、該合成系に用いる反応槽が透析手段によって調製され、無細胞
- 15 胞タンパク質合成系に関与する材料物質と無細胞タンパク質合成反応産物が透析膜を介して分離され、合成タンパク質を回収することが可能な無細胞タンパク質合成手段。
20. (補正後)請求の範囲第18～19項のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成手段において、少なくとも合成反応の鋳型となるmRNA、
- 20 エネルギー再生系酵素、基質、エネルギー源から選ばれた要素について追加・保存・交換・排出から選択される処置を導入する連続無細胞タンパク質合成手段。
21. (削除)
22. (補正後)含浸槽とこれに密封可能に装着される蓋部とを含む構成
- 25 からなる、請求の範囲第19項に記載の無細胞タンパク質合成手段を用いる連続無細胞タンパク質合成装置であって、該装置に基質及び／又は

エネルギー源の導入手段である入口と透析外液の含浸槽内の液室につながる出口をもつ流路、透析外液中の代謝産物等の排出手段である含浸槽内の液室に存する入口と外部につながる出口をもつ流路、mRNA及び／又はエネルギー再生系酵素の導入手段である入口と透析外液の含浸槽

5 内の液室に存する透析膜の機能を有する媒体を担持する装置を使い、少なくとも合成反応の鑄型となるmRNA、エネルギー再生系酵素、基質、エネルギー源から選ばれた要素について追加・保存・交換・排出から選択される処置を導入する連続無細胞タンパク質合成手段。

10

15

20

25

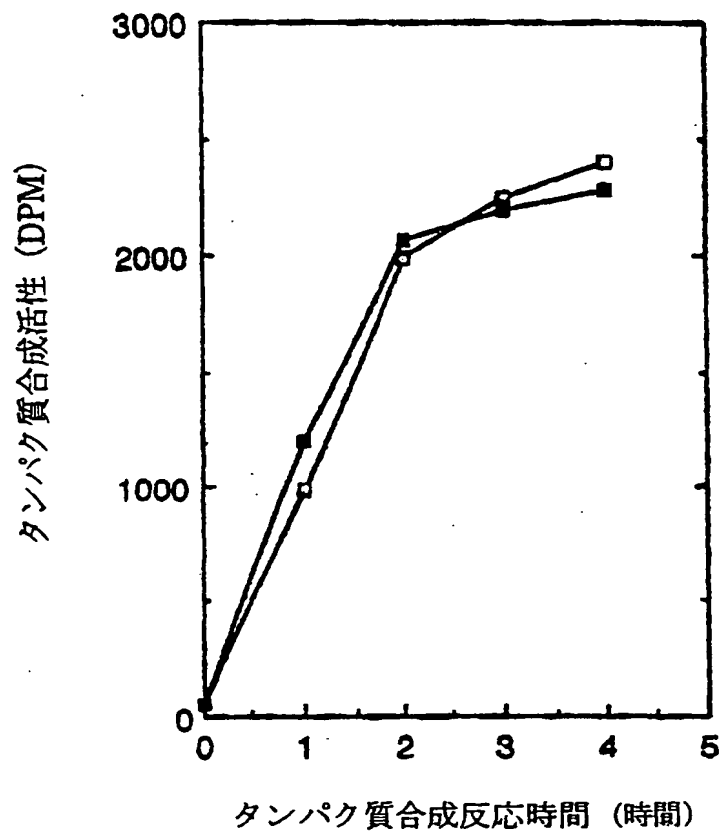


## 条約 19 条に基づく説明書

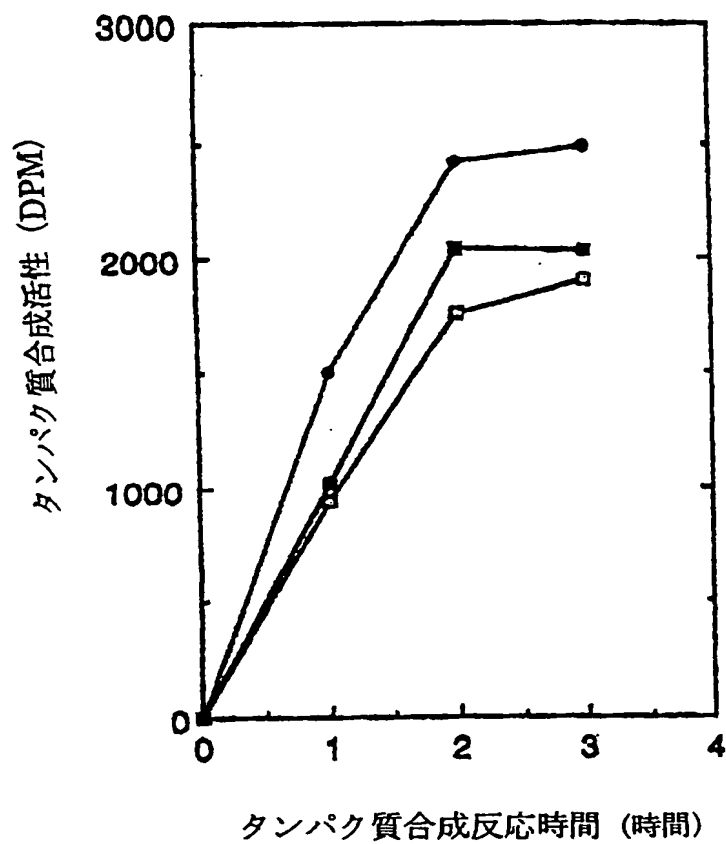
- 請求の範囲第 1 項は、引用文献（JP,7-203984：遠藤弥重太）との差  
5 異を明確にした。本出願の発明は、この引用文献の発明者と同一人で  
あり、この引用文献の技術を実用的な面で実施可能とした。精製度を  
完璧なものとし、それによって、今回特定した室温保存可能で、長時  
間の継続反応を達成しうるレベルの小麦胚芽抽出物をえ、これを含有  
する無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤の提供に成功したも  
10 のである。

他の請求の範囲は、この変更した請求の範囲 1 を引用し・変更した請  
求の範囲 12、18、19、20、22を補正し、その他の不要の請  
求の範囲を集約化・削除した。

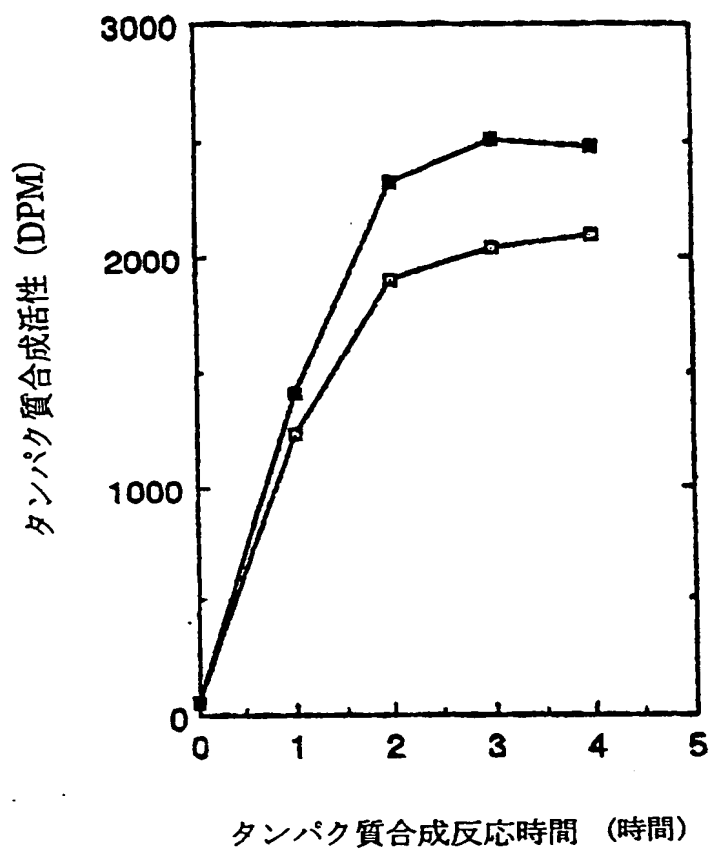
第1図



第2図

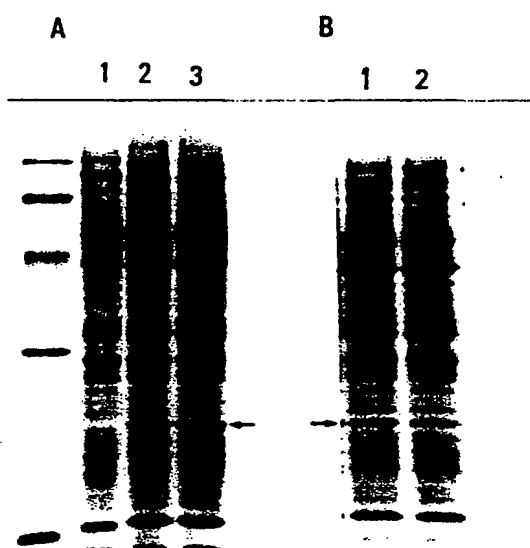


第3図

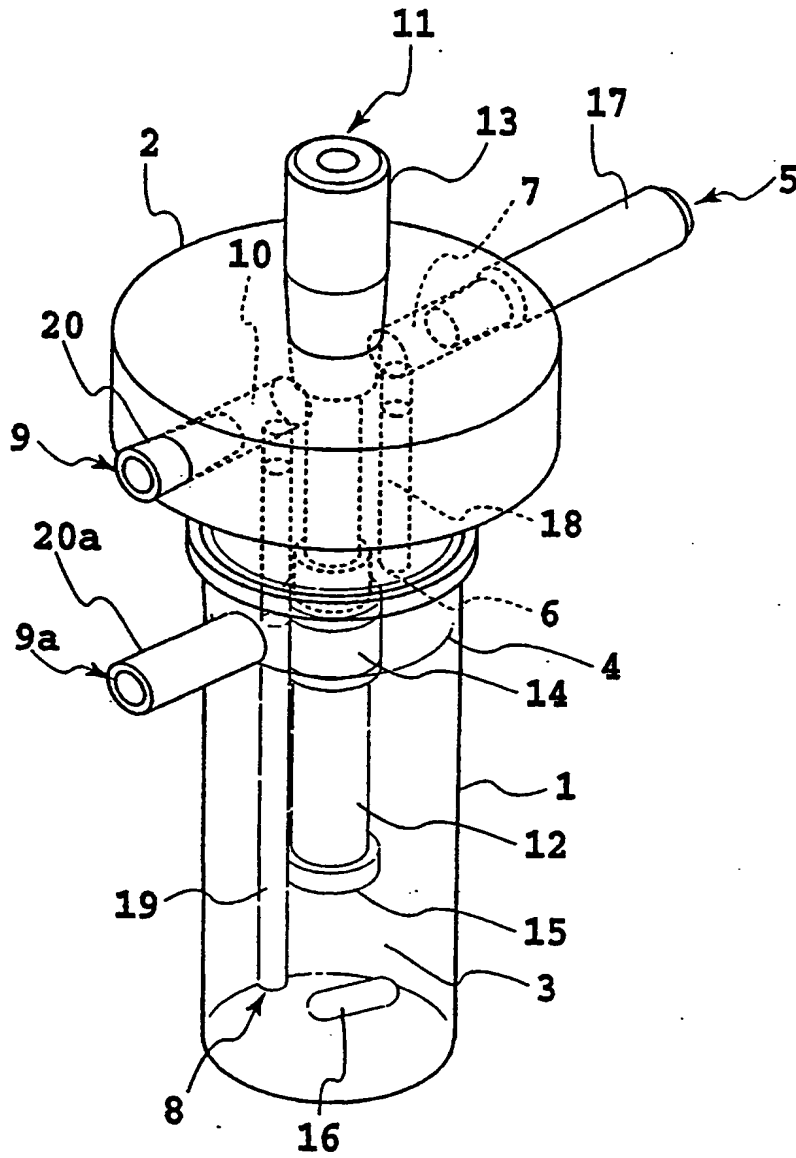


第4図

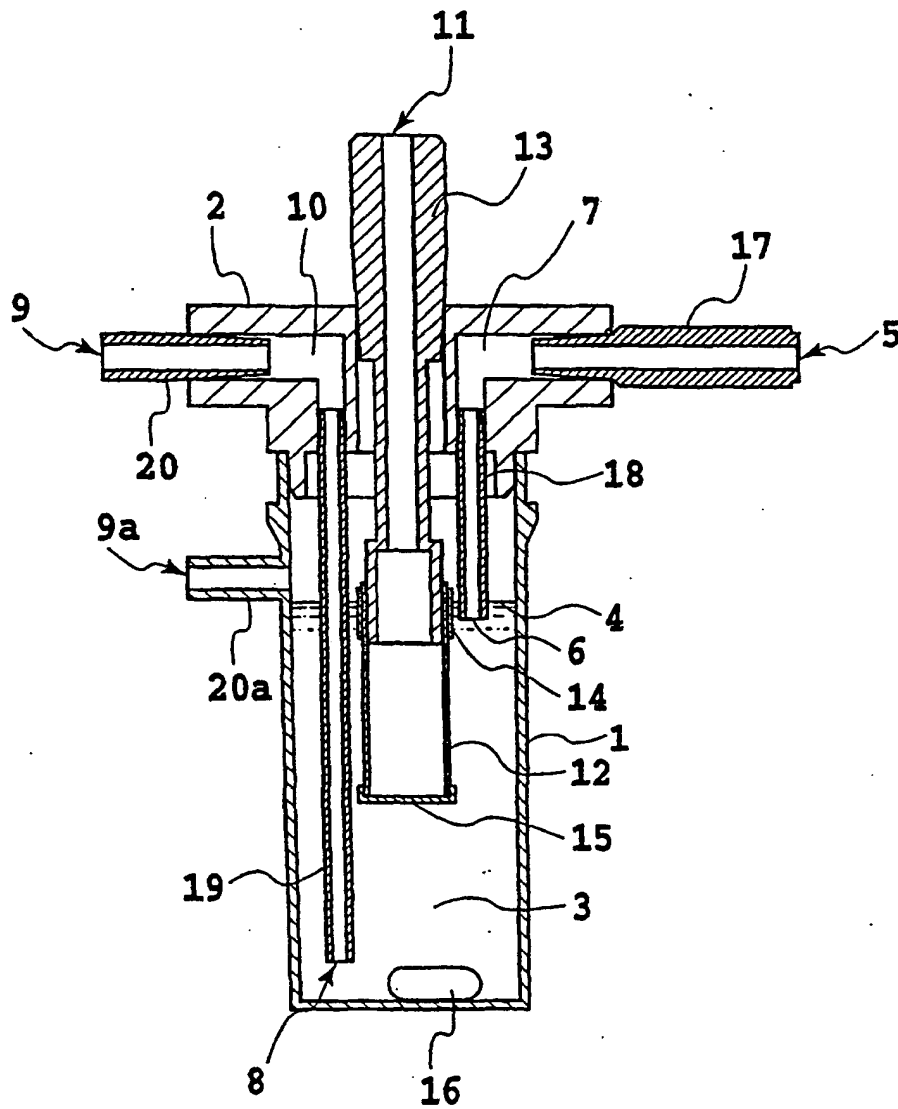
カラムを利用した無細胞タンパク質合成



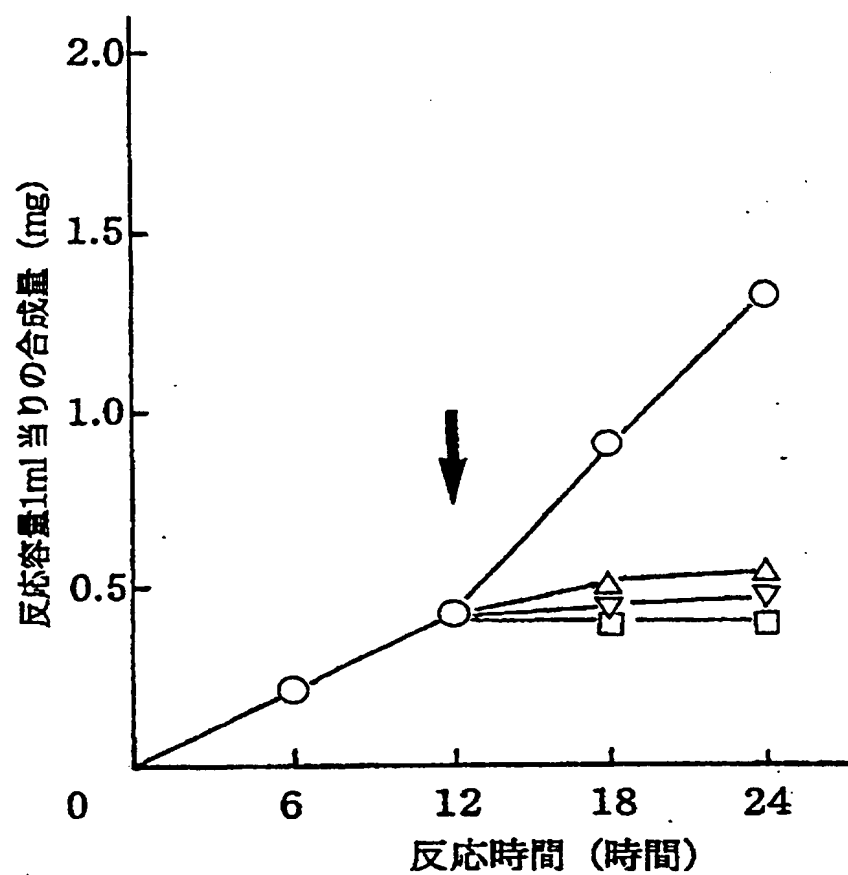
第5図



第6図

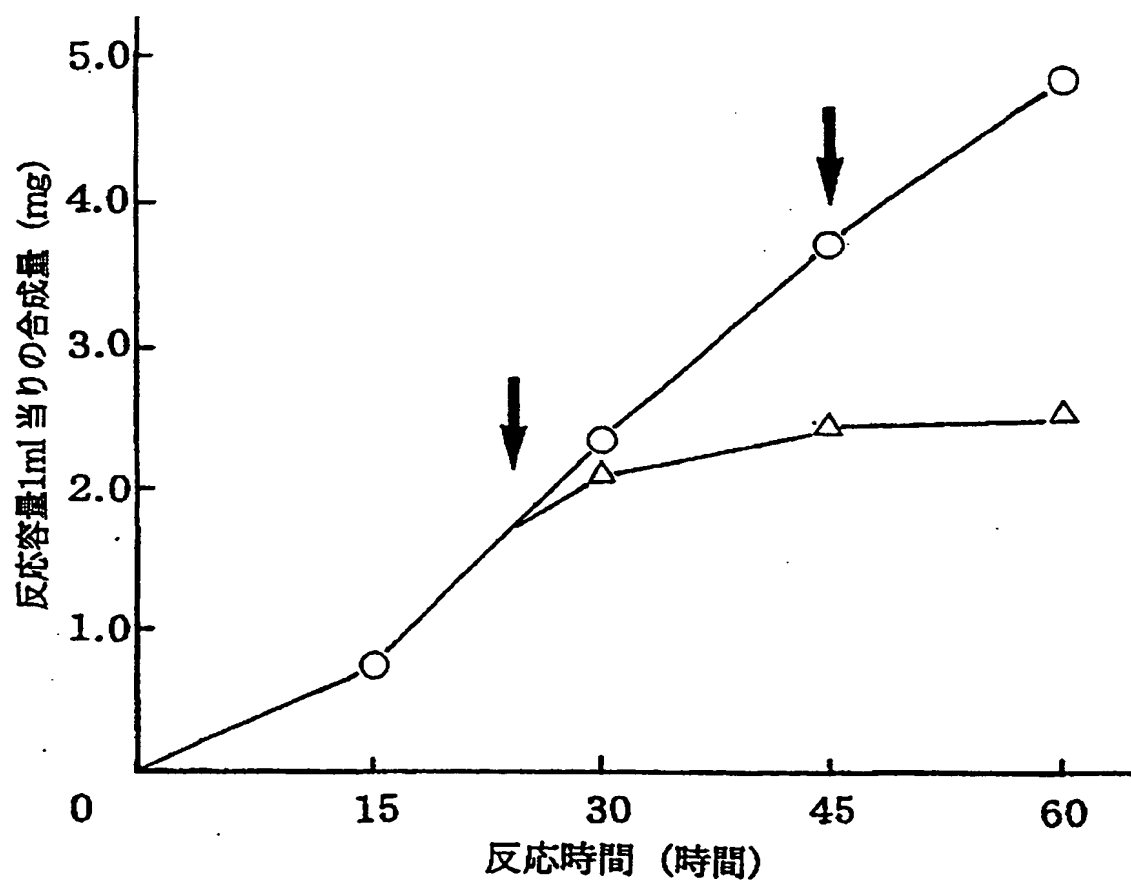


第7図

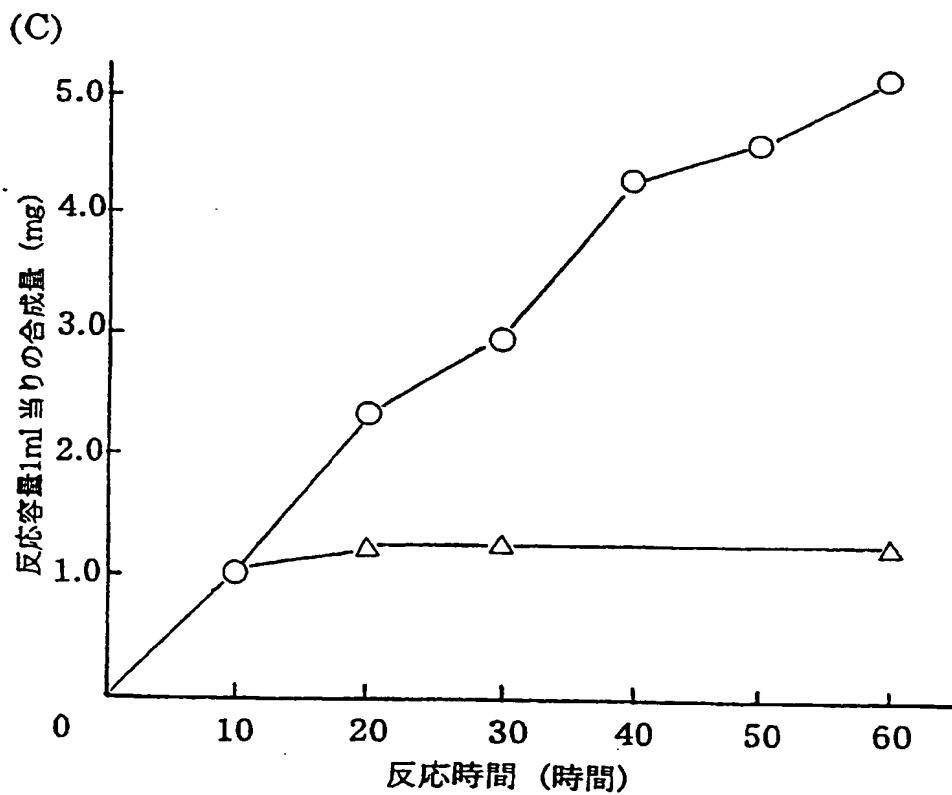
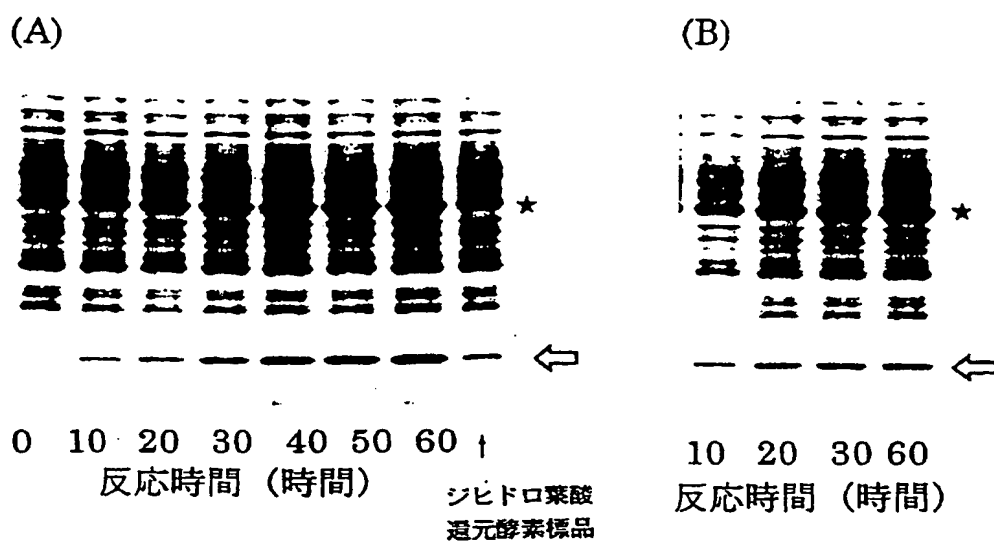




第8図



第9図



生物体から、自己のタンパク質合成反応の阻害に関与する系を排除することによって調製した細胞抽出物を含む無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤と、無細胞タンパク質合成用の反応槽を備えた無細胞タンパク質合成反応装置と、それらに利用するキットが開示されている。この製剤は、室温保存可能であつてかつ該細胞抽出物の生物学的機能を維持した状態の製剤として調製される。さらに、自己のタンパク質合成反応の阻害物質が実質的に排除された細胞抽出物からなる無細胞タンパク質合成手段において、少なくとも合成反応の鋳型となるmRNA、エネルギー再生系酵素、基質、エネルギー源から選ばれた要素について追加・保存・交換・排出から選択される処置を導入する連続無細胞タンパク質合成手段が開示されている。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国ユーゴスラヴィア	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェンコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04088

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12P21/00, C12N15/10, C12M1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12P21/00, C12N15/10, C12M1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	JP, 7-203984, A (Yaeta Endou), 8 August, 1995 (08. 08. 95) (Family: none)	1, 9, 13, 14/ 2-8, 19-22/ 10-12, 15-18
Y	WO, 98/02532, A1 (INVITEK GmbH), 22 January, 1998 (22. 01. 98) & EP, 917568, A	2-8
Y	JP, 10-80295, A (Nippon Flour Mills, Co., Ltd.), 31 March, 1998 (31. 03. 98) (Family: none)	19-22
A	JP, 6-503477, A (PROMEGA CORP.), 21 April, 1994 (21. 04. 94) & WO, 93/07287, A1 & AU, 9227921, A & EP, 566714, A & US, 5324637, A	1-17
A	JP, 7-147992, A (Kobe Steel, Ltd.), 13 June, 1995 (13. 06. 95) (Family: none)	1-17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
27 September, 1999 (27. 09. 99)Date of mailing of the international search report  
5 October, 1999 (05. 10. 99)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C12P21/00, C12N15/10, C12M1/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C12P21/00, C12N15/10, C12M1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y/A	JP, 7-203984, A(遠藤弥重太) 8. 8月. 1995(08. 08. 95) (ファミリーなし)	1, 9, 13, 14/2 -8, 19-22/10- 12, 15-18
Y	WO, 98/02532, A1(INVITEK GmbH) 22. 1月. 1998(22. 01. 98) & EP, 917568, A	2-8
Y	JP, 10-80295, A(日本製粉株式会社) 31. 3月. 1998(31. 03. 98) (ファミリーなし)	19-22
A	JP, 6-503477, A(PROMEGA CORP.) 21. 4月. 1994(21. 04. 94) & WO, 93/ 07287, A1 & AU, 9227921, A & EP, 566714, A & US, 5324637, A	1-17

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 09. 99

国際調査報告の発送日

05.10.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

滝本 晶子

4 B

9452

電話番号 03-3581-1101 内線 344

## C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 7-147992, A(株式会社神戸製鋼所) 13. 6月. 1995 (13. 06. 95) (ファミリーなし)	1-17

FP 99-1004/PC7



(613 of 1277)

Presentation: Image:

Français



(21) Int. Application Number: PCT/JP99/04088	(51) International Patent Classification 6:	(11) Int. Publication Number: WO 00/68412
(22) Int. Filing Date: 29 July 1999 (29.07.1999)	C12P 21/00, C12N 15/10, C12M 1/00	(43) Int. Publication Date: 16 November 2000 (16.11.2000)
(30) Priority Data  11/130393 11 May 1999 JP (11.05.1999)  11/130395 11 May 1999 JP (11.05.1999)  11/151599 31 May 1999 JP (31.05.1999)	A1	
(71) Applicants:  WAKENYAKU CO., LTD. 17, Nishimizuhoshi-cho, Ichijoji, Sakyo-ku, Kyoto- shi, Kyoto 606-8171 ; (JP). [JP/JP]. (for all designated states except US)	(54) PREPARATION CONTAINING CELL EXTRACT FOR Title: SYNTHESIZING CELL-FREE PROTEIN AND MEANS FOR SYNTHESIZING CELL-FREE PROTEIN No Image Available.	
(71)(72) Applicant and Inventor:  ENDO, Yaeta 478-17, Kumanodai, Matsuyama- shi, Ehime 791-8016 ; (JP). [JP/JP].	(57) Abstract  A preparation for synthesizing a cell-free protein which contains a cell extract prepared by eliminating from an organism systems relating to the inhibition of self-protein synthesis reactions; an apparatus for synthesizing a cell-free protein provided with a reaction tank for synthesizing the cell-free protein; and a kit to be used therefor. The above preparation is obtained as a product which can be stored at room temperature while sustaining the biological functions of the cell extract. A means for continuously synthesizing a cell-free protein comprising a cell extract from which substances inhibiting self-protein synthesis reactions have been substantially eliminated, involving a procedure selected from among addition, preservation, exchange and discharge of a factor selected from among mRNA serving as a template in the synthesis reactions, an enzyme participating in the energy regeneration system, a substrate and an energy source.	
(72) Inventor; and (75) Inventor/Applicant:  NISHIKAWA, Shigemichi Wakenyaku Co., Ltd., Kusatsu Center, 945-1, Aza Tsujide, Shimogasa- cho, Kusatsu-shi, Shiga 525-0029 ; (JP) [JP/JP].		
(74) Agent:  SHOJI, Tskashi 1F, Dai- ichi Seno Building, 9-9, Iwamotocho 3-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 101- 0032 ; (JP).		
(81) Designated States:  AU, CA, CN, IL, KR, US ; Eurasian patent ( AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM ); European patent ( AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE )		
Published  With international search report.  With amended claims and statement.		

P C T

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
(PCT36条及びPCT規則70)

出願人又は代理人 の書類記号 FP99-1004	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/04088	国際出願日 (日.月.年) 29.07.99	優先日 (日.月.年) 11.05.99
国際特許分類 (IPC) Int. Cl <sup>7</sup> C12P21/00, C12N15/10, C12M1/00		
出願人 (氏名又は名称) 和研薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

☒ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で 3 ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 02.12.99	国際予備審査報告を作成した日 21.03.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 平田 和男 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 7823



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 1-28 ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
請求の範囲 第 1-14 項、 29.02.00 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 図面 第 1-9 ~~ページ~~/図、 出願時に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☒ 請求の範囲 第 15-22 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲 1 - 14 有  
請求の範囲 無

進歩性 (IS)

請求の範囲 1 - 14 有  
請求の範囲 無

産業上の利用可能性 (IA)

請求の範囲 1 - 14 有  
請求の範囲 無

## 2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

胚乳を完全に除去した胚芽抽出物無細胞蛋白質合成系は、国際調査報告に列記されたいずれの文献にも記載されておらず、当業者にとって自明なものでもない。

## 請 求 の 範 囲

1. (補正後) 自己のタンパク質合成反応の阻害に関与する系を実質的に排除することによって調製した無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤であって、胚芽抽出物から該胚芽抽出物に混入する胚乳を完全に除去することを特徴とする無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。
2. (補正後) 自己のタンパク質合成反応の阻害に関与する系を排除する方法が、非イオン性界面活性剤を用いて、胚芽抽出物进行处理することを特徴とする請求の範囲第1項に記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。
3. (補正後) 非イオン性界面活性剤を用いて、胚芽抽出物进行处理する方法が、超音波処理により、洗浄液が白濁しなくなるまでおこなうことを特徴とする請求の範囲第2項に記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。
4. (補正後) 自己のタンパク質合成反応の阻害に関与する系を排除することが、リボソームの脱アデニン化を制御することである請求の範囲第1～3項のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。
5. (補正後) 自己のタンパク質合成反応の阻害に関与する系を排除するために、リボソームの脱アデニン化を制御する物質を添加する請求の範囲第1項に記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。
6. (補正後) 非イオン性界面活性剤と、リボソームの脱アデニン化を制御する物質を添加することによって胚芽进行处理する請求の範囲第1項に記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。
7. (補正後) 請求の範囲第1～6項のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物を含む物質を、室温保存可能であって、該細胞抽出物の生物学的機能を維持した状態の製剤に調製したことを特徴とする無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。

8. (補正後) 製剤が、乾燥製剤である請求の範囲第7項に記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。

9. (補正後) 製剤化が、凍結乾燥処理によっておこなわれる請求の範囲第8項に記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。

5 10. (補正後) 請求の範囲第1～9項のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤を用いる無細胞タンパク質合成系において、該合成系に用いる反応槽が分子篩可能な担体によって調製され、無細胞タンパク質合成系に關与する材料物質が該担体を移動相として展開され、展開中に無細胞タンパク質合成反応が実行され、その結果として、合成タンパク質を回収することが可能な無細胞タンパク質合成手段。

11. (補正後) 請求の範囲第1～9項のいずれかに記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤を用いる無細胞タンパク質合成系において、該合成系に用いる反応槽が透析手段によって調製され、無細胞タンパク質合成系に關与する材料物質と無細胞タンパク質合成反応産物が透析膜を介して分離され、合成タンパク質を  
15 回収することが可能な無細胞タンパク質合成手段。

12. (補正後) 請求の範囲第10項又は第11項に記載の無細胞タンパク質合成手段において、少なくとも合成反応の鋳型となるmRNA、エネルギー再生系酵素、基質、エネルギー源から選ばれた要素について追加・保存・交換・排出から選択される処置を導入する連続無細胞タンパク質合成手段。

20 13. (補正後) 小麦胚芽から胚乳成分の夾雑を完全に除去するために、小麦胚芽を非イオン性界面活性剤で洗浄する工程を含む処理をなしてえられる小麦胚芽抽出物を含有する無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤であって、この小麦胚芽抽出物の脱アデニン化率が1%以下であり、この小麦胚芽抽出物の乾燥製剤が室温保存も可とする安定性を保持し、この小麦胚芽抽出物を使用したタンパク質合成  
25 基質等の補充を伴う連続無細胞タンパク質合成において少なくとも合成開始後24時間目においても定常的な合成能を有し、さらに24時間目において少なくとも

- も  $1\text{ mg/ml}$  以上の合成量をもつ、無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有製剤。
14. (補正後) 含浸槽とこれに密封可能に装着される蓋部とを含む構成からなる、請求の範囲第11項に記載の無細胞タンパク質合成手段を用いる連続無細胞タンパク質合成装置であって、該装置に基質及び／又はエネルギー源の導入手段である
- 5 入口と透析外液の含浸槽内の液室につながる出口をもつ流路、透析外液中の代謝産物等の排出手段である含浸槽内の液室に存する入口と外部につながる出口をもつ流路、mRNA及び／又はエネルギー再生系酵素の導入手段である入口と透析外液の含浸槽内の液室に存する透析膜の機能を有する媒体を担持する装置を使い、少なくとも合成反応の鋳型となるmRNA、エネルギー再生系酵素、基質、エネルギー
- 10 源から選ばれた要素について追加・保存・交換・排出から選択される処置を導入する連続無細胞タンパク質合成手段。
- 15 15.
16. ;
- 17.
18. 削除
19. 削除
20. 削除
- 21.
22. 削除